

Kombinierte Imaging FT-IR und MALDI-TOF-MS: Ortsauflösende Analytik pflanzlicher Oberflächen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplomchemikerin Andrea Fiedler
geboren am 23. April 1980 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wilhelm Boland Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie
Jena, Abteilung Bioorganische Chemie
2. Prof. Dr. Dieter Klemm Institut für Organische und Makromolekulare
Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen	1
1.2 Aufbau und Struktur der Blattoberfläche	4
1.3 Biosynthese der pflanzlichen Kutikularlipide	6
1.4 Funktionen und Abwehrreaktionen der pflanzlichen Kutikula	10
1.5 Methoden zur Analyse und Charakterisierung der Blattoberfläche	13
2 Zielstellung	17
3 Ergebnisse und Diskussion	23
3.1 Kombinierte Oberflächenanalytik aus FT-IR und MALDI-TOF-MS	23
3.1.1 Entwicklung eines geeigneten Probensträgers	23
3.1.2 Isolation der Blattwachse unter Erhalt der räumlichen Verteilung	25
3.1.3 Transmissions-FT-IR-Spektroskopie	28
3.1.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	34
3.2 Qualitative und quantitative Analyse der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers	41
3.2.1 Darstellung der Alkylester- und Aldehyd-Referenzen	41
3.2.2 Qualitative und quantitative Analyse mittels GC-MS und GC-FID	42
3.2.3 Analyse der Epikutikularwachse mittels FT-IR und MALDI-TOF	44
3.2.4 Identifikation der unbekanntesten Verbindungen	47
3.3 Kombinierte Imaging FT-IR- und MALDI-TOF-MS zur Analyse der Blattoberfläche des Kirschlorbeers	54
3.3.1 Analyse der Wachstverteilung auf der adaxialen Blattoberfläche	54
3.3.2 Dynamische Entwicklung und Oberflächenverteilung der Ester	60
3.4 Untersuchung von Wundheilungsprozessen der pflanzlichen Kutikula	71
3.4.1 Reaktion der Blattoberfläche auf mechanische Verwundung	72
3.4.2 Reaktion der Blattoberfläche auf Pilzbefall	80
4 Zusammenfassung	89
5 Experimenteller Teil	96
5.1 Kultivierung der Versuchspflanzen	96
5.2 Instrumente	96
5.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	96

5.2.2	Lichtmikroskopie	97
5.2.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	97
5.2.4	Elementaranalyse (CHN-Analyse)	97
5.2.5	GC-MS und GC-FID	97
5.2.6	Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)	99
5.2.7	FT-IR-Spektroskopie und Imaging FT-IR	99
5.2.8	MALDI-TOF-MS und Imaging MALDI-TOF-MS	100
5.3	Chemikalien	102
5.4	Probenträger für die Imaging FT-IR und MALDI-TOF-MS	103
5.5	Synthesen	104
5.5.1	⁷ Lithium-2,5-dihydroxybenzoat (1)	104
5.5.2	Alkylacetate (C ₂₀ (2), C ₂₄ (3), C ₂₆ (4), C ₂₈ (5), C ₃₀ (6))	104
5.5.3	2-Iodoxybenzoesäure (IBX, (7))	106
5.5.4	Aldehyde (C ₂₂ (8), C ₂₄ (9), C ₂₆ (10), C ₂₈ (11), C ₃₀ (12))	107
5.6	Versuchsanordnungen	109
5.6.1	<i>Kryo-adhesive</i> Extraktion der Blattwachse	109
5.6.2	Vergleich von Reflexions-FT-IR und Transmissions-FT-IR	109
5.6.3	Bestimmung signifikanter Schwingungen in der FT-IR	109
5.6.4	Vergleich der Matrixsysteme und Bestimmung der Detektionslimits (LODs) in der MALDI-TOF-MS	110
5.6.5	Qualitative und quantitative Analyse der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers	111
5.6.6	Analyse der Kirschlorbeerwachse mit FT-IR und MALDI-TOF-MS	113
5.6.7	Identifikation der unbekanntten Verbindungen	113
5.6.8	Analyse der Wachsverteilung auf der adaxialen Blattoberfläche	114
5.6.9	Dynamische Entwicklung und Oberflächenverteilung der Ester	115
5.6.10	Reaktion der Blattoberfläche auf mechanische Verwundung	116
5.6.11	Reaktion der Blattoberfläche auf Pilzbefall	117
6	Literaturverzeichnis	119
7	Danksagung	132
8	Lebenslauf	134
	Selbständigkeitserklärung	136

9	Anhang	137
9.1	¹ H-NMR-, ¹³ C-NMR-, EI-MS- und IR-Spektren	137
9.2	LOD-Bestimmung der Referenzverbindungen für die MALDI-TOF-MS	162
9.2.1	LOD-Bestimmung der Einzelverbindungen	162
9.2.2	LOD-Bestimmung des äquimolaren Referenzgemisches	164
9.3	Qualitative und quantitative Analyse der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers	166
9.4	Identifikation der unbekanntten Verbindungen	170
9.5	Kombinierte Imaging FT-IR- und MALDI-TOF-MS zur Analyse der Blattoberfläche des Kirschlorbeers	175
9.5.1	Analyse der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers	175
9.6	Untersuchung von Wundheilungsprozessen der pflanzlichen Kutikula	176
9.6.1	Reaktion der Blattoberfläche auf mechanischer Verwundung	176
9.6.2	Reaktion der Blattoberfläche auf Pilzbefall	177

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

⁷ LiDHB	⁷ Lithium-(2,5-dihydroxy)-benzoat
A	(Peak)Fläche
ACP	Acylcarrier-Protein
AE	Alkylester (Eicosansäureeicosylester)
AFM	Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (Attenuated Total Reflection)
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CH	<i>n</i> -Alkane (Tetracosan)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DMSO-d ₆	perdeutertes Dimethylsulfoxid
EI	Electron Impact
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAS	Fatty Acid Synthase
FE	Fatty Acid Elongase
FID	Flammenionisationsdetektion
FS	Fettsäuren (Hexacosansäure)
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot (Spektroskopie)
FT-Raman	Fourier-Transform-Raman (Spektroskopie)
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HR-MS	hochauflösende Massenspektrometrie
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
KAS	β -Ketoacyl-ACP-Synthase
KF	Korrekturfaktor
LOD	Detektionslimit (Limit of Detection)
LTP	Lipid-Transfer-Protein
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
OH	primäre Alkohole (Hexacosanol)
PEG	Polyethylenglykol
PL1-12	Kirschlorbeerproben (<i>Prunus laurocerasus</i>) 1 bis 12

REM	Rasterelektronenmikroskop
RF	Responsefaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Retentionszeit
SD	Standardabweichung
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie
TOF	Time of Flight
tr.	Spurenkomponenten (Traces, < 0,5 %)
VLCFA	Very Long Chain Fatty Acids (Fettsäuren mit C-Kette > 18)
WS	Wachs-Synthese
ZnS	Zinksulfid, Zinksulfidfenster des entwickelten Probenträgers

IR-Spektroskopie

δ	Deformationsschwingung
ν	Valenzschwingung
ν_s	symmetrische Valenzschwingung
ν_{as}	asymmetrische Valenzschwingung
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [cm^{-1}]

Massenspektrometrie

Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
eV	Elektronenvolt
kDa	Kilodalton [1000 Da]
$[M]^+$	Molekülion
m/z	Masse-Ladungsverhältnis

NMR-Spektroskopie

d	Dublett
dd	Dublett von Dublett
dt	Dublett von Triplet
δ	chemische Verschiebung [ppm]
J	Kopplungskonstante [Hz]
m	Multiplett
s	Singulett
t	Triplet

1 Einleitung

1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Allen bekannten Organismen ist es zu eigen, auf Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren. Pflanzen, als nicht zum Ortswechsel befähigte Lebewesen, mussten im Laufe der Evolution leistungsfähige Strategien zum Schutz gegen biotische und abiotische Umwelteinflüsse entwickeln.

Neben mechanischen Barrieren wie Dornen, Stacheln und Trichomen^[1, 2] verfügen Pflanzen über vielfältige chemische Verteidigungsmechanismen.

Diese Wehrchemie kann konstitutiv, das heißt permanent präsent sein, wie z.B. die Toxine der europäischen Eibe (*Taxus baccata*)^[3] und der Luzerne (*Medicago sativa* L.)^[4]. Neben der konstitutiven Abwehr existieren auch induzierte Wehrmechanismen, die erst in Folge eines realen Befalls aktiviert werden. Ein solches Beispiel induzierter Abwehr ist die Duftstoffemission der Baumwolle (*Gossypium hirsutum* L.) unter Befall mit der Zuckerrübenmotte (*Spodoptera exigua* Hübner)^[5].

Die induzierte chemische Pflanzenabwehr kann gegenüber der konstitutiven Produktion von Verteidigungssubstanzen von Vorteil sein, da sie durch den Einsatz von komplexen Multikomponentengemischen die Ausbildung von Resistenzmechanismen auf Seiten des schädigenden Organismus erschwert^[6].

Darüber hinaus ist diese temporär wirksame Verteidigung für den Energiehaushalt der Pflanze möglicherweise ökonomischer und ressourcenschonender, da erst im Bedarfsfall die Bildung von Abwehrchemikalien in Gang gesetzt wird^[6].

Einen solchen Bedarfsfall erkennt die Pflanze durch charakteristische Biomoleküle, so genannte „Elicitoren“. Ein Beispiel für ein solches induziertes Abwehrsystem ist die Biosynthese des Pflanzentoxins Nikotin im Tabak (*Nicotiana glauca*)^[7]. Mechanische Verwundung und Herbivorie induzieren die Bildung des Nikotins und lassen dessen Konzentration im pflanzlichen Gewebe bis auf das 40fache im Vergleich zu ungeschädigten Pflanzen ansteigen.

Über diese *direkten* chemischen Abwehrreaktionen hinaus existieren auch pflanzliche Verteidigungsmechanismen, die auf einem höheren trophischen Level agieren. Diese *indirekte* Abwehr kann beispielsweise das Anlocken von natürlichen Feinden des die Pflanze attackierenden Herbivors sein. Durch fraßinduzierte Freisetzung leichtflüchtiger Duftstoffe vermag die Pflanze Raubinsekten oder Parasiten anzulocken^[8, 9].

So ist die Limabohne (*Phaseolus lunatus*) in der Lage, unter Befall durch Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) bereits nach wenigen Stunden ein komplexes Duftbouquet zu emittieren. Hauptbestandteile dieses flüchtigen Gemisches sind Terpene wie Ocimen, Linalool und Caryophyllen, aber auch von Fettsäuren abgeleitete Substanzen wie (Z)-3-Hexenylacetat sowie aromatische Verbindungen wie Methylsalicylat oder Indol. Über die Freisetzung dieser Duftstoffe kann die Limabohne Raubmilben (*Phytoseilus persimilis*) anlocken, zu deren Beute die herbivoren Spinnmilben zählen^[10].

Maispflanzen (*Zea mays* L.) bedienen sich ebenfalls der Emission von Duftstoffen. Diese Duftstoffe besitzen unterschiedliche chemische Zusammensetzung bei rein mechanischer Verwundung gegenüber Herbivorie durch Raupen der Zuckerrübenmotte (*Spodoptera exigua* Hübner). Die parasitierende Raubwespe (*Cotesia marginiventris* Cresson) nutzt diese charakteristischen Duftstoffe zur Lokalisierung schädlingbefallener Pflanzen und somit ihrer Beute^[11]. Durch diese Art der Abwehr sind Pflanzen in der Lage, indirekt den Fraßdruck auf sich zu verringern.

Über das Anlocken von Predatoren hinaus dient diese Duftstoffemission aber auch der inter- und intra-pflanzlichen Kommunikation. Es ist bekannt, dass die Duftstoffe auch über größere Distanzen hinweg in benachbarten, nicht befallenen Pflanzen^[12] und Pflanzenteilen^[13] Verteidigungsmechanismen auslösen können. So regt die Zugabe der Phytohormon Jasmonsäure oder Methyljasmonat in ungeschädigten Blättern des Sellerie (*Apium graveolens*) die Bildung toxischer Furocumarine an^[14].

Dieser pflanzliche Informationsaustausch ist aber nicht nur auf Individuen ein und derselben Gattung beschränkt, wie am Beispiel des Wildtabaks (*Nicotiana attenuata*) und des Wüstenbeifuß (*Artemisia tridentata*) gezeigt wurde. Beide Pflanzen existieren in ihrer natürlichen Umgebung vergesellschaftet.

Die durch mechanische Verwundung verursachte Emission von Methyljasmonat im Wüstenbeifuß löst in benachbarten Tabakpflanzen einen Anstieg an fraßhemmend wirkenden Polyphenoloxidasen aus^[15]. Abbildung 1 stellt die beschriebenen direkten und indirekten pflanzlichen Abwehrmechanismen dar.

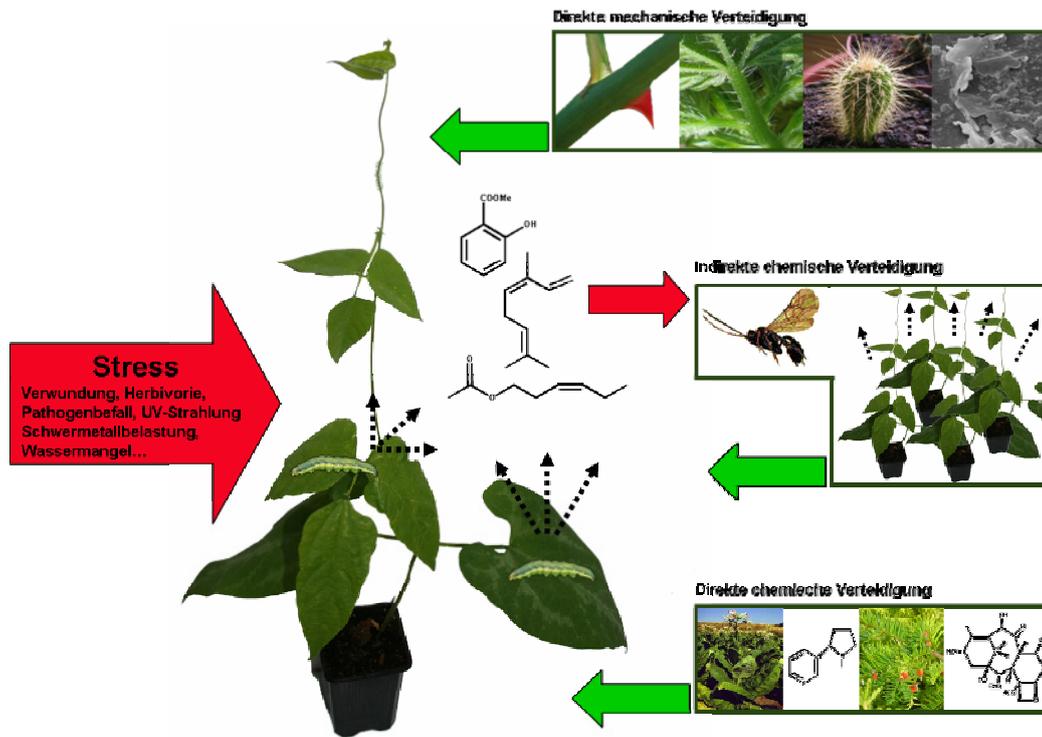


Abb. 1: Pflanzliche Verteidigungsstrategien: direkte mechanische Verteidigung durch die Anatomie der Pflanze (erste trophische Ebene), direkte chemische Verteidigung über Toxine gegen Herbivore (zweite trophische Ebene) und indirekte chemische Abwehr durch Duftemission zum Anlocken von Predatoren (dritte trophische Ebene) und Auslösen systemischer Reaktionen in Nachbarpflanzen.

Alle induzierten Abwehrmechanismen greifen allerdings erst nach einer Induktionsperiode, wenn schon ein gewisser Grad der Schädigung an der Pflanze vorliegt. Daher sind präventive bzw. permanent aktive Schutzsysteme, die einen Fraß- oder Pathogenbefall erschweren oder verhindern, für die Pflanzen physiologisch ebenso bedeutsam^[16].

Der Blattoberfläche als direktem Grenzbereich zwischen dem Organismus und seiner Umwelt fällt diesbezüglich eine besondere Rolle zu, wobei ihre pflanzenphysiologischen Funktionen maßgeblich durch ihren strukturellen Aufbau bestimmt werden.

1.2 Aufbau und Struktur der Blattoberfläche

Nach heutiger Terminologie wird die pflanzliche Oberhaut, die Kutikula, in Cutin, ein Biopolymer aus dreidimensional veresterten ω -Hydroxy- und ω -Hydroxyepoxy-Fettsäuren, und in die so genannten kutikularen Wachse unterteilt. Bei den kutikularen Wachsen differenziert man weiterhin zwischen den amorphen, in der Cutinmatrix eingebetteten intrakutikularen Wachsen, und den sogenannten epikutikularen Wachsen, die die gesamte Pflanzenoberfläche als Film und Kristalloide bedecken^[17] [Abb. 2].

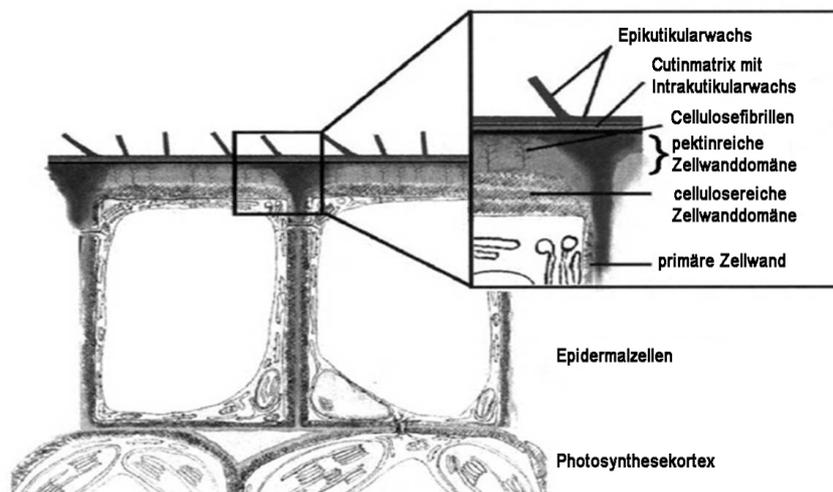


Abb. 2: Schematischer Aufbau pflanzlicher Blattoberflächen aus Epidermalzellen, Cellulosegerüst, Cutinmatrix mit eingebetteten intrakutikularen Wachsen sowie als Film und Kristalloide auftretende Epikutikularwachse (angelehnt an Kunst, Progress in Lipid Research 2003).

Diese Wachsgemische setzen sich hauptsächlich aus langkettigen, aliphatischen Lipiden zusammen, die die Klassen der n-Alkane^[18], primären und sekundären Alkohole^[19], Ketone^[20] und Aldehyde^[21], Ester sowie der freien Fettsäuren^[19] umfassen.

Auch höher funktionalisierte, aliphatische Verbindungen wie ungesättigte oder verzweigte Alkane, α,ω -Diole^[22], γ -Diole^[23], γ -Hydroxyaldehyde^[24], β -Diketone oder ω -Hydroxyfettsäuren sind beschrieben, treten aber meist nur als Nebenkomponenten in Erscheinung^[25].

Darüber hinaus können auch komplexere Verbindungen des pflanzlichen Sekundärmethabolismus, wie Triterpenoide^[18], Phenolsäuren^[26] und -ester^[27], Flavonoide oder Sterole^[28] Bestandteile der Blattwachse sein.

Die Bezeichnung „Wachse“ basiert hier also nicht auf der chemischen Definition als Ester aus Fettsäure und Fettalkohol, sondern ist ein durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Blattoberfläche geprägter, historisch begründeter Terminus^[29]. Zum besseren Verständnis wird der Begriff der Wachse in dieser Arbeit ausschließlich zur Bezeichnung der pflanzlichen Blattlipide verwendet.

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung dieser Lipide kann zwischen verschiedenen Pflanzenarten^[30-32], Pflanzenteilen^[33] bzw. Wachstumsstadien einer Pflanzenspezies zum Teil stark variieren^[19]. Häufig jedoch stellt eine einzige Substanzklasse den Hauptbestandteil des Wachsgemisches dar und ist innerhalb ihrer homologen Reihe auch überwiegend mit nur einer spezifischen Kettenlänge vertreten. Aus der großen kompositorischen Variabilität der Wachsschicht ergibt sich ein breites Spektrum ihrer morphologischen Erscheinung. So werden heute mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) die Wachse hinsichtlich der Form einzelner Kristalloide in 23 Typen klassifiziert, die wiederum bei übergeordneter Orientierung und Aggregation in charakteristische Verteilungsmuster, wie Wachsfilme oder Krusten, unterschieden werden können^[34] [Abb. 3].

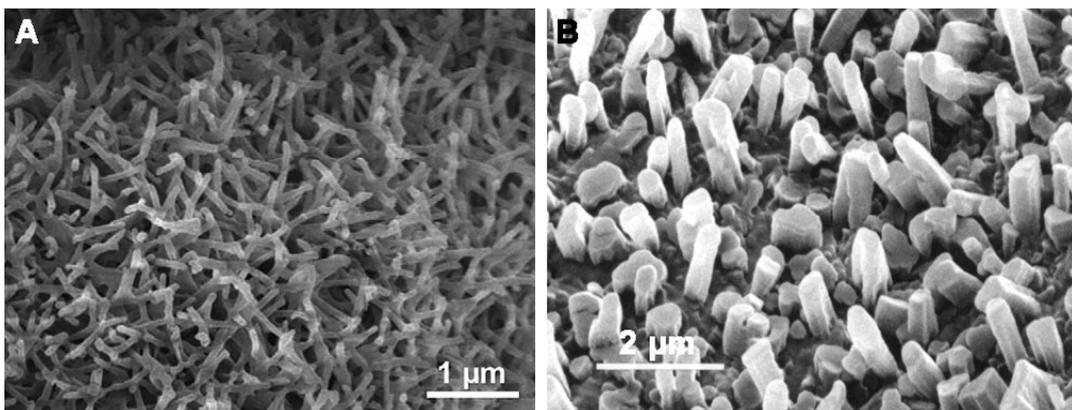


Abb. 3: REM-Aufnahmen verschiedener Aggregationsformen kutikularer Wachse: A) „transversely ridged rotlets“ (schräg gezahnte Stäbchen) der Sommerknotenblume (*Leucojum aestivum*), aus Meusel *et al.*^[35], B) röhrenförmige, als „tubules“ bezeichnete Wachsplättchen der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*), aus Wen *et al.*^[36].

1.3 Biosynthese der pflanzlichen Kutikularlipide

Biosynthetisch entstammen die aliphatischen Blattwaxe der *de novo* Fettsäurebiosynthese, die in den Leukoplasten lokalisiert ist.

Die Synthese erfolgt dabei über einen wiederholten Zyklus von vier Reaktionsschritten: der Kondensation eines Acetyl-Acyl-Carrier-Protein (Acetyl-ACP) mit einem Malonyl-ACP, gefolgt von Reduktion, Dehydratisierung und erneuter Reduktion zu einer um zwei C-Atome verlängerten Acylkette. Enzymatisch wird die Synthese durch den Fettsäure-Synthase-Komplex (FAS) katalysiert. Dieser umfasst neben den Kondensationsenzymen β -Ketoacyl-ACP-Synthase III (KASIII, für Kettenlängen C_2 bis C_4), KAS I (für den Kettenaufbau von C_4 bis C_{16}) und KAS II (Verlängerung von C_{16} zu C_{18}) auch die kettenlängen-unabhängig wirkenden Enzyme β -Ketoacyl-ACP-Reduktase, β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase und Enoyl-ACP-Reduktase^[37, 38] [Abb. 4].

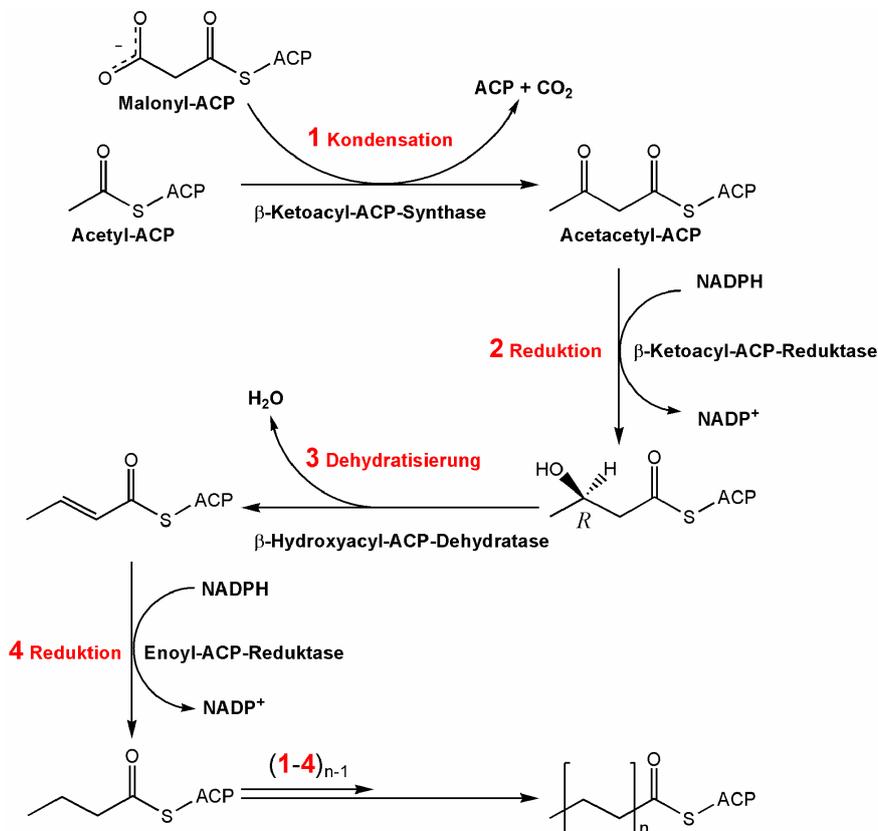


Abb. 4: Schematische Darstellung der Fettsäurebiosynthese mit einer aktivierten Acetyl-ACP-Startereinheit und aktivierten Malonyl-Einheiten zum Aufbau von Palmitylketten ($n=14$).

Die Stereochemie der Hydroxylgruppe des in Schritt 2 gebildeten (3*R*)-Hydroxyacyl-Substrates ist dabei spezifisch für den Fettsäureaufbau. Die anschließende Wasserabspaltung durch die β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase setzt eine *R*-Konfiguration der β -Hydroxylgruppe voraus, wohingegen beim Fettsäureabbau, der β -Oxidation, die Reaktion des entsprechenden *S*-Isomers bedarf.

Für den Aufbau von Fettsäuren mit mehr als 18 C-Atomen, den ‚Very Long Chain Fatty Acids‘ (VLCFA), muss die Fettsäure unter Abspaltung des ACP und anschließender Aktivierung in das endoplasmatische Retikulum (ER) überführt werden. Die Kettenverlängerung um jeweils eine C₂-Einheit erfolgt dann durch den Multienzymkomplex der Fettsäure-Elongase (FE) ebenfalls über vier konsekutive, enzymatische Reaktionsschritte. Der Kondensation von Malonyl-ACP mit dem ACP-veresterten Fettsäuresubstrat folgen die β -Ketoreduktion, die Dehydratisierung und die abschließenden Enoylreduktion.

Diese Zyklen müssen zum Aufbau typischer Fettsäuren mit 20 bis 34 Kohlenstoffatomen wiederholt durchlaufen werden. Auch hier ist eine kettenlängenabhängige Spezifität der Kondensationsenzyme zu beobachten, bislang ist aber noch ungeklärt, wie viele dieser Enzyme beim Aufbau der Kohlenstoffketten von C₂₀ bis C₃₄ zum Einsatz kommen^[37].

Die Darstellung langkettiger Wachse erfolgt dann ausgehend von diesen Fettsäuren entweder über den Acyl-Reduktions-Weg zur Bildung von primären Alkoholen und Wachsestern, oder über den Decarbonylierungsweg zur Synthese von Aldehyden, Alkanen, sekundären Alkoholen und Ketonen^[17, 39, 40] [Abb. 5].

Der Acyl-Reduktions-Weg ist sowohl als zweistufiger Prozess über intermediäre Aldehyde zu primären Fettalkoholen am Beispiel von Brokkoli (*Brassica oleracea*)^[41] beschrieben, als auch als einstufige Reduktion ohne isolierte Aldehydzwischenstufe in Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*) beobachtet^[42]. Die Reduktion der Fettsäuren zu primären Alkoholen scheint also über spezifische Acyl-ACP-Reduktasen als Ein- bzw. Zweischnittmechanismus erfolgen zu können.

Die anschließende Bildung von Estern wird durch die Wachsester-Synthase (WS) katalysiert und kondensiert primäre Fettalkohole mit langkettigen Acyl-ACP zu Wachsestern^[43] [Abb. 5].

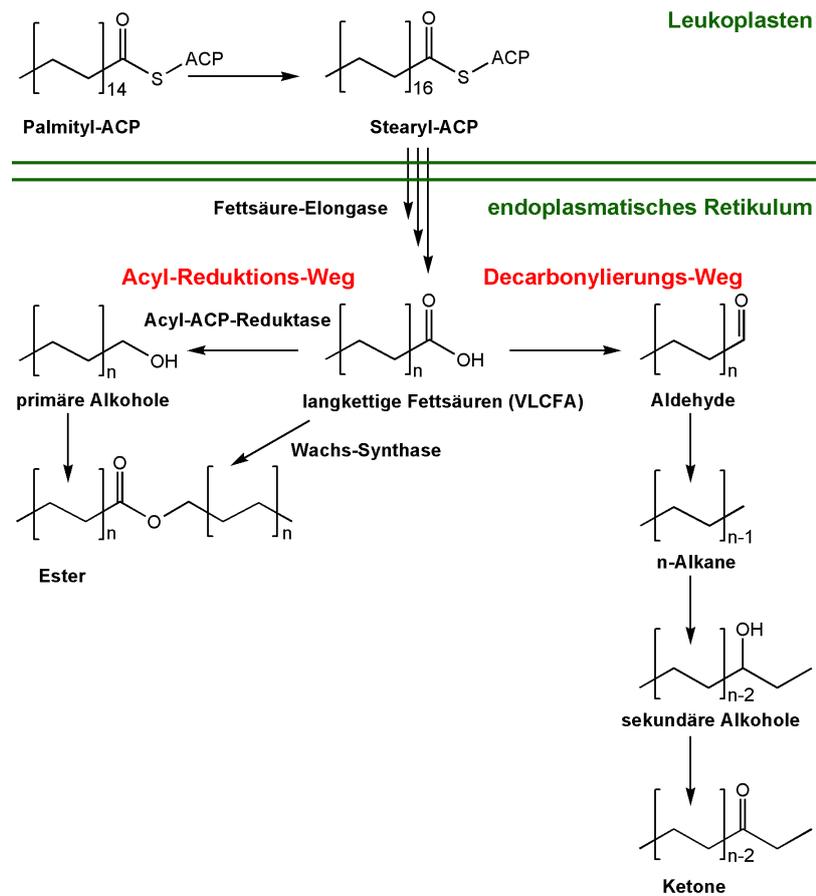


Abb. 5: Schematische Darstellung der Wachsbiosynthese: Kettenverlängerung des Palmityl-ACP durch Kondensation mit Malonyl-ACP ($18 \leq n \leq 32$), Umwandlung der VLCFA in primäre Alkohole und Ester (Acyl-Reduktions-Weg), unter Kettenverkürzung zu n-Alkanen, sekundären Alkoholen und Ketonen (Decarboxylierungs-Weg).

Die Biosynthese von Alkanen ausgehend von sehr langkettigen Fettsäuren wird über den Decarboxylierungsweg beschrieben. Dabei können die Kohlenwasserstoffe einerseits als Endprodukt der Wachsbiosynthese auftreten, oder andererseits als Intermediate zur Darstellung sekundärer Alkohole und Ketone weiter umgesetzt werden. Da bis heute die zwei an diesem Prozess als beteiligt vermuteten Enzyme noch nicht hinreichend isoliert und charakterisiert werden konnten, stellt der Mechanismus der Decarboxylierung über Aldehydzwischenstufen den bislang am wenigsten verstandenen Teil der Wachsbiosynthese dar^[37]. Ebenso ist die Darstellung von Aldehyden über den Status der Zwischenstufen hinaus bislang ungeklärt.

Zur weiterführenden Umwandlung von Alkanen in sekundäre Alkohole und Ketone konnten Labellingexperimente die Beteiligung einer gemischtfunktionellen Oxidase aufzeigen. Für Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) konnte ein Cytochrom P450-abhängiges Enzym isoliert werden, das sowohl die Hydroxylierung des Alkans am sekundären Kohlenstoffatom, als auch die anschließende Oxidation zum Keton katalysiert^[44].

Ein alternativer Weg der Biosynthese langkettiger Ketone und Alkane (C₂₇-C₃₃) über eine Claisen-Kondensation von Palmityl- und Stearylketten wurde Mitte des vergangenen Jahrhunderts diskutiert^[45, 46]. Unter Kopf-Kopf-Addition, anschließender Decarboxylierung und Reduktion sollen ungeradzahlige n-Alkane und Ketone gebildet werden. Experimente mit isotope markierten Acetaten an Brokkolipflanzen (*Brassica oleracea*) widerlegen aber aufgrund der Markierungsmuster in den gebildeten Produkten diesen hypothetischen Reaktionsweg und stützen den von VLCFA ausgehenden Decarbonylierungsweg^[47-51].

Alle bislang bekannten Enzyme der Wachsbiosynthese sind im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und lassen vermuten, dass der gesamte Prozess der Wachsproduktion in diesem intrazellulären Bereich verläuft.

Wie der Transport der stark hydrophoben Wachse aus dem ER zur Plasmamembran und durch die Zellwand hindurch auf die pflanzliche Oberhaut erfolgt, ist bislang noch unbekannt. Aus Stängeln der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) konnten zwei potentielle Transportproteine isoliert werden (CER5 und WBC11), die Teil eines ATP-Binding-Cassette-Transporters sind und für den Wachstransport genutzt werden könnten. Ein direkter Beweis, dass diese Proteine Wachsmoleküle als Substrat binden, liegt bislang aber noch nicht vor. Somit stellt der Transfer durch die hydrophile Zellwand hindurch zur Kutikula mittels Lipid-Transfer-Proteinen (LTP) zwar die aktuelle Theorie zum Transportmechanismus dar^[52, 53], ist wegen fehlender experimenteller Ergebnisse aber bislang noch nicht bewiesen^[54, 55]. Experimente mit isolierten Kutikulas und rekristallisiertem Wachs zeigen ein hohes Diffusionsvermögen organischer Nichteletrolyte durch diese Membranen, weshalb auch ein passiver, über einen Konzentrationsgradienten vermittelter Transport für den Aufbau der Pflanzenoberhaut diskutiert wird^[56].

1.4 Funktionen und Abwehrreaktionen der pflanzlichen Kutikula

Der stark lipophile Charakter der pflanzlichen Außenhaut ist maßgebend für ihre vielfältigen Funktionen als direkte Kontaktzone zwischen Pflanze und Umwelt. An erster Stelle steht dabei die Regulierung des pflanzlichen Wasserhaushaltes und aller nicht-stomatalen Transpirationsvorgänge.

Aufgrund ihres extrem hydrophoben Aufbaus verhindert die Kutikula die Wasserdiffusion aus dem pflanzlichen Gewebe zur Atmosphäre beinahe vollständig und kann hinsichtlich dieser Permeabilitätseigenschaft mit synthetischen Polymeren wie Polyethylen oder Polypropylen verglichen werden^[57, 58]. Umgekehrt unterbindet sie das unkontrollierte Eindringen von Wasser in das pflanzliche Gewebe, was zum Auswaschen von Mineralien und polaren Nährstoffen führen würde.

So wie die Kutikula nahezu unpassierbar für polare, wässrige Lösungen oder Elektrolyten ist, dient sie der Pflanze zur Aufnahme lipophiler, organischer Verbindungen via Diffusion^[59-61].

Durch den apolaren Charakter der Kutikula und aufgrund ihrer komplexen Oberflächenstruktur wird die Benetzbarkeit durch Wasser extrem vermindert. Die epikutikularen Wachskristalle bilden dabei Unebenheiten im Mikro- und Nanometerbereich und verringern dadurch erheblich die Kontaktfläche zwischen Wassertropfen und Blatt. Der daraus resultierende hohe Kontaktwinkel führt zu einem starken Abperlen der Wassertropfen. Gleichermäßen wird die Anhaftung von Kontaminationen, wie Staub, Pollen oder Sporen, durch die geringe Anzahl an Kontaktpunkten mit der Oberfläche minimiert. Dieses Wechselspiel aus Oberflächenbeschaffenheit und -chemie führt zu einem Selbstreinigungsmechanismus, der als Lotus-Effekt bezeichnet wird^[62, 63]. Durch das Abperlen der Wassertropfen nehmen diese Verunreinigungen auf und spülen sie von der Oberfläche ab. Dieser Reinigungsprozess ist nicht nur auf (an)organische Kontaminationen beschränkt, sondern spielt auch in der Pathogenabwehr der Pflanze eine entscheidende Rolle^[64].

Rasterelektronenmikroskopische Studien zeigen, dass mit erhöhter Benetzbarkeit der Blattoberfläche auch der Grad der Kontamination ansteigt^[65]. Wie am Beispiel von Efeu (*Hedera helix* L.) beschrieben, kann die Pflanze durch Reduktion der Oberflächenfeuchtigkeit entscheidend Einfluss auf die mikrobielle Besiedlungsdichte ihrer Blätter nehmen^[66, 67], da die Anhaftung der Mikroorganismen auf der Oberfläche erschwert wird.

Darüber hinaus dient die Kutikula auch als mechanische Penetrationsbarriere. Der Einfluss epikutikularer Wachse auf das Infektionsvermögen von Pathogenen wurde an Kohlrabi (*Brassia oleracea* L.) nach unterschiedlicher Oberflächenbehandlung und an Erbsenmutanten (*Pisum sativum* L.), die hinsichtlich der Größe und Dichte ihrer Wachskristalle variieren, untersucht.

Die Infektion mit *Botrytis cinerea*, einem fast ausschließlich über die Kutikula penetrierenden Pilz, erfolgt umso stärker, je höher der Grad der Oberflächenzerstörung bzw. je geringer ausgeprägt die Wachsbeladung ist^[68].

Über die Funktion als Penetrationsbarriere hinaus können verschiedene Bestandteile der Blattwachse auch inhibierend auf das Keimen und Ausbilden von Appressorien wirken, wie am Beispiel langkettiger Alkohole im Oberflächenwachs der Avocado (*Persea americana*) gezeigt wurde^[69].

Neben inhibitorischen Effekten sind für die Pflanze-Pathogen-Interaktion auch stimulierende Einflüsse der Kutikula auf die Ausbreitung und Sporenbildung gewisser Pilze bekannt, was im Falle von Entomopathogenen zu einer indirekten Erhöhung der Pflanzenfitness beiträgt. So induzieren Oberflächenextrakte von Chinakohl (*Brassica rapa* var. *pekinensis*), Mairübe (*Brassica rapa* cv. Tokyo cross) und Raps (*Brassica napus*) die Keimung des Pilzes *Metarhizium anisopliae* und erhöhen dessen Virulenz gegenüber Larven des Meerrettichblattkäfers (*Phaedon cochleariae* Fabricius)^[70].

Langkettige Alkohole als weit verbreitete Bestandteile der epikutikularen Wachse scheinen auch eine direkte fraßmindernde Wirkung auszuüben. So wird die Resistenz bestimmter Tabaksorten gegenüber der Amerikanischen Tabakeule (*Heliothis virescens*) hohen Konzentrationen an n-Docosanol (C₂₂-Alkohol) im Wachs zugeschrieben^[71]. Dieser Alkohol besitzt ebenfalls antivirale Eigenschaften^[72].

n-Triacontanol (C_{30} -Alkohol) soll hingegen das Fraßverhalten der gefleckten Alfaalfa-Blattlaus (*Therioaphis maculata*) auf der Luzerne vermindern^[73]. Neben diesem fraßmindernden Einfluß wirkt n-Triacontanol auch stimulierend auf das Wachstum bestimmter Pflanzen, wie am Beispiel von Mais (*Zea mays* L.), Reis (*Oryza sativa* L.) und Hafer (*Hordeum vulgare* L.) gezeigt werden konnte^[74].

Über diese indirekte Abwehr von Herbivoren hinaus agiert die kutikulare Blattstruktur auch bei der direkten Verteidigung der Pflanze gegen Fraßfeinde. So lokalisieren viele Insekten ihre Wirtspflanzen anhand bestimmter Stimulantien. Der Meerrettichblattkäfer erkennt seine Futterpflanze Raps (*Brassica napus*) beispielsweise über Glucosinolate. Mittels modifizierter Extraktionsverfahren konnte nachgewiesen werden, dass sich diese Glucosinolate nicht in den epikutikularen Wachsen des Blattes befinden und die Käfer entwachste Blattoberflächen gegenüber unbehandelten als Futter präferieren^[75].

Die Wachsschicht scheint also nicht Träger dieser Stimulantien zu sein, sondern eher über die Funktion der mechanischen Barriere hinaus als Abschirmung für im Pflanzeninneren befindliche, anregende Botenstoffe zu dienen.

Neben einer Verringerung des Fraßschadens üben kutikulare Wachse auch Einfluss auf das Eiablageverhalten von Insekten aus, wobei diese im allgemeinen solche Phänotypen bevorzugen, die weniger stark mit Wachs beladen sind^[76]. Inwiefern das in einer verbesserten Beweglichkeit des Insektes aufgrund einer erhöhten Anhaftung auf der Blattoberfläche oder im Fehlen abschreckend wirkender Wachsbestandteile begründet liegt, ist bis heute noch ungeklärt. Es ist aber bekannt, dass die Struktur der Oberflächenwachse erheblichen Einfluss auf die Motilität und Adhäsion von Insekten ausübt^[77]. Generell sind Pflanzen mit ausgeprägter Wachsschicht besser gegen Fraß und Eiablage geschützt, da ihre glatte, rutschige Oberfläche die Anhaftung der Insekten erheblich erschwert^[78].

So wurde beobachtet, dass Gerste (*Hordeum vulgare*) bei steigender Wachsbeladung der Blätter einen geringeren Fraßschaden durch die Haferblattlaus (*Rhopalosiphum padi*) zeigte^[79]. Herbivore Insekten bevorzugen als Lebenshabitat im Allgemeinen die Phänotypen mit verringerten bzw. vollständig entfernten Oberflächenwachsen^[76, 80, 81]. Im Laufe der Evolution haben sich trotzdem einige Insekten auf Wirtspflanzen mit stark ausgebildeter Wachsschicht spezialisiert.

Dieses Alleinstellungsmerkmal einer bestimmten Insektenspezies führte zu sehr effektiven symbiotischen Gemeinschaften, wie zum Beispiel der spezialisierten Ameisen (*Crematogaster/ Camponotus*) und ihrer Wirtspflanze, den Macaranga-Bäumen (*Macaranga esculenta*)^[82, 83].

Die rutschige Beschaffenheit ihrer Oberfläche nutzen Pflanzen jedoch nicht nur zum Fernhalten von Schädlingen, sondern auch in umgekehrter Weise für die Bereicherung ihres eigenen Nährstoffhaushalts. Karnivore Pflanzen nutzen Insekten zur Deckung ihres Stickstoff- und Phosphorbedarfs. Diese Insekten werden über verschiedene visuelle und olfaktorische Reize zu der Falle, einem hoch spezialisierten kannenförmigen Blatt gelockt, in dem sich ein pflanzlicher Verdauungssaft befindet. Die Innenwände dieser Fallen sind mit speziellen Wachsen so bedeckt, dass das Entkommen für einmal darin befindliche Beute nahezu unmöglich ist. Der Einfluss von Struktur und Zusammensetzung dieser epikutikularen Wachse auf den Beuteerfolg wurde am Beispiel verschiedener Kannenpflanzen der *Nepenthes*-Spezies untersucht^[84, 85].

Trotz ihrer chemisch eher einfachen Struktur und Zusammensetzung leistet die Kutikula einen entscheidenden Beitrag zur Verteidigung und Fitness des pflanzlichen Organismus und steht seit mehr als 150 Jahren im Fokus wissenschaftlicher Studien.

1.5 Methoden zur Analyse und Charakterisierung der Blattoberfläche

Mit der Einführung der Elektronenmikroskopie war es möglich, die kutikularen Wachse in ihrer Morphologie und Verteilung auf der pflanzlichen Oberfläche zu beschreiben^[86, 87]. Die ‚Atomic Force Microscopy‘ (AFM) ermöglicht darüber hinaus die topographische Darstellung der Blattoberflächen und der sie bedeckenden Wachse in hoher räumlicher Auflösung direkt am pflanzlichen Gewebe^[88-90] oder an isolierten Kutikulas^[91-93]. So lässt sich die morphologische Verteilung der Wachse auf der Blattoberfläche darstellen, ohne aber Information über deren chemische Zusammensetzung zu erhalten.

Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR) und Fourier-Transform-Raman-Spektroskopie (FT-Raman) finden zunehmend Verwendung in der Strukturaufklärung und taxonomischen Bestimmung kutikularer Wachse anhand bestimmter funktioneller Gruppen^[94-98]. Aufgrund der spezifischen Schwingungseigenschaften von Atomgruppen lassen sich auch in komplexen Substanzgemischen einzelne Komponenten über ihre funktionellen Gruppen isoliert bestimmen, wie am Beispiel von Carbonylverbindungen^[99] oder Phenylestern^[100] in verschiedenen pflanzlichen Wachsen gezeigt werden konnte. Unterschiede in der polymeren Struktur der Innen- und Außenseite verschiedener Nußschalen^[101] wurden mittels FT-IR-Mikrospektroskopie untersucht. Besonders die abgeschwächte Totalreflexion Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (ATR FT-IR) kommt bei der qualitativen Analyse von Blattoberflächen zum Einsatz, da sie auch bei geringen Substanzmengen ohne weitere Probenvorbereitung direkt am biologischen Material angewandt werden kann^[102].

Die FT-Raman-Spektroskopie findet ergänzend zur FT-IR-Spektroskopie insbesondere bei der Analyse der Kohlenstoffgerüste ungesättigter Moleküle und Ringsysteme Verwendung, wie beispielsweise bei der Bestimmung von Carotinoiden^[103, 104] und Triterpenoiden^[105].

Mittels Röntgenfluoreszenzanalyse und Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) wurde die chemische Zusammensetzung der Blattoberfläche des Kirschlorbeers (*Prunus laurocerasus* L.) untersucht^[106]. Während die Röntgenfluoreszenzanalyse Information über die elementare Zusammensetzung liefert, erhält man mittels der SIMS Aufschluss über alle in der Probe enthaltenen Molekülmassen.

Auch mittels Festkörper-NMR^[107] oder Isotopenlabelling-Experimenten^[108] wurden Blattwachse bezüglich Morphologie und Oberflächenchemie untersucht.

Die qualitative und quantitative Analyse der kutikularen Wachse erfolgt üblicherweise durch Lösungsmittelextraktion der Pflanzenoberfläche und Charakterisierung der gelösten Lipide mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)^[109-111]. Die enzymatische Isolation der Kutikula erlaubt darüber hinaus auch die Gewinnung des polymeren Cutins und die Untersuchung dessen einzelner Monomere^[112-114].

Die große Variabilität in der Wachszusammensetzung allein schon innerhalb einer Spezies aber verlangt nach selektiveren Extraktionsmethoden.

Über so genannte *adhesive* Extraktionsverfahren, in denen vornehmlich epikutikuläre Wachskristalle nach Einbetten in eine Transferflüssigkeit isoliert wurden, gelang es erstmalig, intra- und epikutikuläre Wachse getrennt zu gewinnen^[92].

Untersuchungen am Kirschlorbeer (*Prunus laurocerasus*) zeigten, wie unterschiedlich beide Wachsschichten aufgebaut sein können. Entgegen bisherigen Studien sind die Triterpene Ursolsäure und Oleanolsäure ausschließlich Bestandteile der intrakutikulären Wachse, wohingegen die epikutikulären Lipide nur aus langkettigen, aliphatischen Verbindungen bestehen^[18, 115].

Über eine andere Art des Oberflächen-Strippings unter Verwendung von Polymeren wie Celluloseacetat oder GumArabicum kann die Ausbeute an Epikutikularwachs erhöht werden, allerdings wurden damit auch intrakutikuläre Lipide extrahiert^[18, 116].

Beide mechanische Probennahmen ermöglichten erstmalig die getrennte Analyse adaxialer und abaxialer Blattoberflächen, die hinsichtlich ihrer Wachszusammensetzung erheblich variieren können.

Während die der Sproßachse zugewandte, adaxiale Blattseite der Erbse (*Pisum sativum*) vorwiegend mit primären Alkoholen bedeckt ist, wird die Wachsschicht der von der Sproßachse abgewandten, abaxialen Oberfläche hauptsächlich aus n-Alkanen aufgebaut^[116].

Die Entdeckung einer solchen transversalen Variation in der Zusammensetzung der Blattwachse lässt vermuten, dass es auch Unterschiede in der lateralen Verteilung auf der Blattoberfläche gibt. Dies zeigt die Notwendigkeit einer Oberflächenanalytik, die über morphologische Informationen hinaus die chemische Natur der Wachse als Funktion ihrer Position auf der Blattoberfläche beschreibt [Abb. 6].

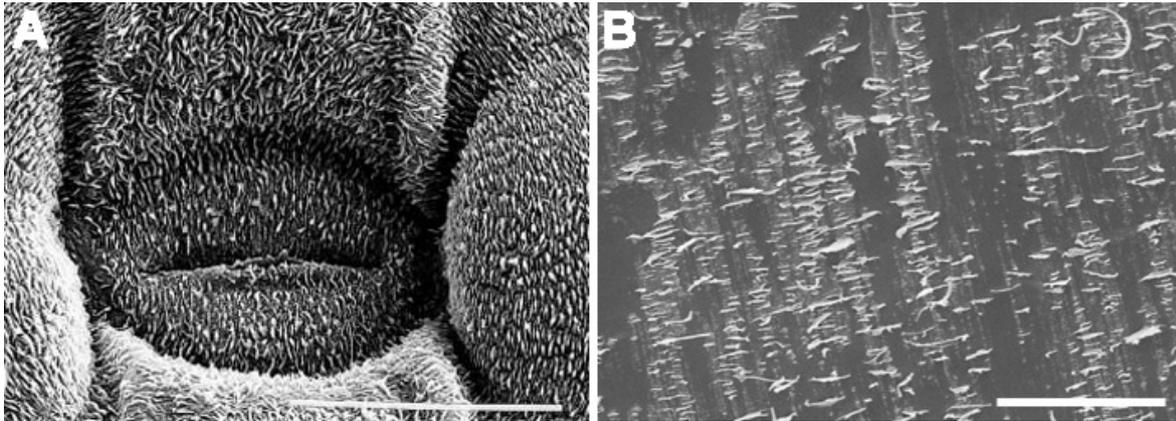


Abb. 6: Übergeordnete Anordnung epikutikularer Wachse A) um die Spaltöffnungen der Blätter des Maiglöckchens (*Convallaria majalis*), aus Neinhuis *et al.*^[117], B) auf der Blattader der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers (*Prunus laurocerasus*). Maßstabsbalken für A) 20 μm , für B) 10 μm .

2 Zielstellung

Trotz vielfältiger Analysemethoden sind noch immer grundlegende Vorgänge in Biosynthese, Transport und Interaktion der pflanzlichen Kutikula mit der Umwelt unbekannt. Auch die Bedeutung der Blattwachse in Prozessen der Wundheilung und Pflanzenverteidigung ist bislang wenig verstanden. Für eine bessere Einsicht in die Funktions- und Regulationsmechanismen der Chemie der Blattoberfläche ist neben der qualitativen Zusammensetzung ihrer Komponenten auch deren Verteilung von entscheidender Bedeutung.

Über die qualitative Analyse hinaus findet besonders die Imaging Raman-Spektroskopie Anwendung bei der Untersuchung der lateralen Verteilung ungesättigter und aromatischer Verbindungen, da deren Kohlenstoff- π -Elektronensysteme aufgrund der Polarisierbarkeit eine hohe Raman-Aktivität zeigen^[118].

So wurde über die Imaging Raman-Spektroskopie die Anordnung von Carotinoiden^[103] oder Triterpenoiden^[119] auf verschiedenen Blattoberflächen untersucht.

Während die Raman-Spektroskopie besonders für die Analyse des Kohlenstoffgrundgerüsts eines Moleküls geeignet ist, liefert die FT-IR-Spektroskopie anhand spezifischer Absorptionsmuster Informationen über funktionelle Gruppen. Somit lassen sich in der Probe vorhandene Substanzklassen identifizieren.

Da die kutikularen Wachse vorwiegend aus langkettigen, gesättigten Verbindungen bestehen, soll die FT-IR-Spektroskopie hier vordergründig eingesetzt werden.

Drei prinzipielle Methoden der FT-IR-Spektroskopie stehen der Oberflächenanalytik zur Verfügung: die Reflexions-FT-IR, die ATR-FT-IR und die Transmissions-FT-IR.

Die ATR-FT-IR-Spektroskopie ist für Imaging-Experimente der Blattoberflächen ungeeignet, da sie für jede Einzelmessung den direkten Kontakt zwischen Probenmaterial und Messapparatur benötigt. Bei kontinuierlich hintereinander erfolgenden Messungen würde dies zu einem Anhaften der weichen, ablösbaren Wachse am Messkristall und somit zum Verschmieren und Verschleppen der Substanzen über die Probenfläche führen.

Die Reflexions-FT-IR, die keinen direkten Probenkontakt benötigt, wurde bisher zur Analyse dünner Gewebeschichten^[120] eingesetzt. Erste Imaging-Experimente wurden zur Unterscheidung zellulärer Strukturen an Querschnitten von Eukalyptusblättern durchgeführt^[121].

Im Falle geringer Analytkonzentrationen oder beim Fehlen stark IR-aktiver, funktioneller Gruppen liefert die Reflexions-FT-IR aber aufgrund der begrenzten Eindringtiefe des IR-Strahls in die Probe nur Spektren geringerer Intensität. Die Untersuchung von Spurenkomponenten würde Aufnahmen mit hohen Scanzahlen pro Spektrum und entsprechend langen Messzeiten erfordern. Ebenso kann der zelluläre Hintergrund der Blattprobe durch störende Fluoreszenzerscheinungen die Qualität der Spektren verringern.

Die Transmissions-FT-IR ist aufgrund der erheblich höheren Empfindlichkeit besonders für Proben geringer Konzentration und zur Auswertung weniger intensiver Absorptionsbanden geeignet.

Wegen der im Vergleich aller drei Messmethoden besten Signal-Rausch-Verhältnisse findet die Imaging Transmissions-FT-IR bereits weit verbreiteten Einsatz in der klinischen Pathologie zur Untersuchung von Krankheitsbildern und -verläufen anhand der Veränderlichkeit des Probengewebes^[122, 123].

Bislang wurde die Imaging Transmissions-FT-IR nur zur Differenzierung pflanzlicher Gewebematerialien wie Zellulose, Stärke oder Lignin in Blattquerschnitten der Gerste (*Hordeum vulgare*) eingesetzt^[124, 125], für die ortsauflösende Analytik von Blattoberflächen ist sie bislang nicht beschrieben.

Aufgrund des zellulären Hintergrundes lassen sich die kutikularen Wachse mittels der Transmissions-FT-IR nicht direkt am Blattmaterial untersuchen, sondern bedürfen einer vorherigen Separation vom Blattgewebe.

Das Fehlen einer geeigneten Isolationsmethode unter Bewahrung der spezifischen Verteilung auf dem pflanzlichen Gewebe hat den Einsatz der Transmissions-FT-IR in der Oberflächenanalytik der Kutikularlipide bislang verhindert.

Basierend auf der von Ensikat *et al.* entwickelten *kryo-adhesiv*-Extraktion epikutikularer Wachse^[92] soll eine Methode zur Gewinnung der Oberflächenlipide unter Bewahrung ihrer natürlichen Verteilung auf der Blattstruktur entwickelt werden, um ihre Verteilung mittels Transmissions-FT-IR-Spektroskopie zu untersuchen.

Für die Strukturaufklärung und Identifikation unbekannter Substanzen ist die Information aus der IR-Spektroskopie allein nicht ausreichend. Es lässt sich nur die Präsenz bestimmter funktioneller Gruppen beobachten bzw. ausschließen.

Bei chemisch ähnlichen Strukturen aber wird die weitere Analyse einzelner Verbindungen innerhalb eines komplexen biologischen Systems schwierig.

Aufgrund ihres nicht-invasiven Charakters ermöglicht die FT-IR-Spektroskopie aber eine anschließende Untersuchung desselben Probenmaterials mit weiteren analytischen Methoden.

Mittels nachfolgender MALDI-TOF-Massenspektrometrie sollten zusätzlich zu den Informationen über funktionelle Gruppen, Molekülstruktur und Molekülbindungen aus der Schwingungsspektroskopie ergänzende Informationen über die in der Probe enthaltenen Substanzen anhand ihrer Molekülmassen zugänglich sein.

Da schon mit einer einzigen Messung eine Vielzahl von Substanzen gleichzeitig detektiert werden kann, eignet sich die MALDI-TOF-MS für die Analytik komplexer Substanzgemische und kleinster Probenmengen^[126].

Darüber hinaus lässt sie sich auf kleine Moleküle, wie pflanzliche Sekundärmetabolite, Glycoside oder Phytohormone mit Massen kleiner 1 kDa^[127] ebenso anwenden, wie zur Analyse großer Peptidketten und Proteine mit mehreren hundert kDa Molgewicht^[128].

Dabei werden die im Analyten enthaltenen Moleküle durch Anregung mit einem Laserstrahl in Molekülionen überführt und anhand ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses detektiert. Innerhalb eines einzigen Experimentes können so zahlreiche Substanzen parallel bestimmt werden.

Um eine hinreichende Ionisation der Probenmoleküle zu gewährleisten und die Ausbeute an Molekülionen zu steigern, ist zuvor aber die Applikation einer geeigneten Matrix notwendig^[129].

Seit Entwicklung der ‚Imaging Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation‘-Massenspektrometrie (Imaging MALDI-MS) durch Caprioli *et al.* erlangt diese insbesondere im Bereich der klinischen Medizin zunehmend an Bedeutung.

So wird die Metabolisierung von Wirkstoffen durch die Analyse gewebespezifischer Anordnungen von Peptiden, Proteinen^[130-132] oder Lipiden^[133] untersucht.

Erste Untersuchungen an verschiedenen Blattgeweben und der Blattoberfläche mittels Imaging MALDI-TOF-MS-Experimenten sind bereits beschrieben.

Am Beispiel der Soja-Pflanze wurde die Resorption verschiedener Herbizide über die Blattoberfläche analysiert^[134].

Eine weitere Studie untersucht die Verteilung von Oligosacchariden im Stängelgewebe des Weizens (*Triticum aestivum*)^[135], bzw. konnte über die Analyse der Verteilung von Glucosinolaten in Blättern der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) das gewebespezifische Fraßverhalten der Baumwollkapselule (*Helicoverpa armigera*) erklärt werden^[136].

Bislang ist die Imaging MALDI-TOF-MS zur Untersuchung von Zusammensetzung und Oberflächenverteilung der unpolaren kutikularen Wachsschicht jedoch noch nicht beschrieben.

Mittels Imaging MALDI-TOF-MS sollen epikutikulare Wachse charakterisiert und hinsichtlich ihrer spezifischen Verteilung auf der Blattoberfläche untersucht werden. Die Entwicklung eines geeigneten Matrixsystems und einer die Oberflächenstruktur bewahrenden Applikationsmethode für die spätere Analyse der Kutikularlipide sind ebenfalls Zielstellungen dieser Arbeit.

In allen hier genannten Beispielen bisheriger Oberflächenanalytik erfolgt die Untersuchung bekannter Substanzen, deren Strukturen über konventionelle Analysemethoden gesichert sind.

Ebenso wie bei der Schwingungsspektroskopie liefert im Falle unbekannter Verbindungen die MALDI-TOF-MS-Analyse allein keine ausreichenden Informationen zur Molekülstruktur.

Die Kombination aus nicht-invasiver Imaging Transmissions-FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS sollte neben der Verteilung bekannter Substanzen auch die Detektion und Identifikation neu auftretender, unbeschriebener Strukturen ermöglichen, da sowohl Informationen zum Molekülaufbau und funktionellen Gruppen, als auch zu den Molekülmassen aller in der Probe enthaltenen Verbindungen zugänglich sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine kombinierte Oberflächenanalytik basierend auf Transmissions-FT-IR-Spektroskopie und MALDI-TOF-MS zu entwickeln und diese anschließend bei der Analyse pflanzlicher Kutikularlipide zum Einsatz zu bringen.

Neben der Untersuchung natürlicher unbeschädigter Pflanzensysteme sollen unter Verwendung der zu entwickelnden Analytik Veränderungen der pflanzlichen Kutikula in Reaktion auf verschiedene äußere Einflüsse beobachtet werden.

Der Kirschlorbeer (*Prunus laurocerasus*) mit einer relativ dicken Wachsschicht wird hier als Modellorganismus gewählt, da die grundlegende Charakterisierung seines Wachssystems^[18, 19, 106, 115], Untersuchungen physikalisch chemischer Eigenschaften seiner Kutikula^[137, 138] und erste Studien ortsauflösender Oberflächenanalytik in der Literatur bereits beschrieben sind^[105, 119].

Darüber hinaus bietet er als immergrüne Pflanze über das gesamte Kalenderjahr hinweg verfügbares Probenmaterial.

Zusammenfassend sind im Rahmen dieser Arbeit für die Entwicklung und Anwendung der ortsauflösenden Oberflächenanalytik aus Imaging FT-IR-Spektroskopie und Imaging MALDI-TOF-Massenspektrometrie folgende Themenstellungen zu bearbeiten:

- Entwicklung eines geeigneten Probensträgers für die ortsauflösende Analytik mittels Imaging Transmissions-FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS,
- Entwicklung einer Extraktionsmethode für epikutikuläre Blattwachse unter Erhalt der natürlichen Verteilung auf der Blattoberfläche,
- Entwicklung eines geeigneten Matrixsystems und einer strukturbewahrenden Matrixapplikation sowie Optimierung der Messparameter für die MALDI-TOF-MS,
- Charakterisierung des pflanzlichen Wachssystems des Kirschlorbeers über konventionelle GC-MS- und GC-FID-Analyse,
- Identifikation unbekannter Substanzen im Wachssystem des Kirschlorbeers,
- Untersuchung der Verteilung epikutikularer Wachse auf der Blattoberfläche des Kirschlorbeers anhand der zu entwickelnden Oberflächenanalytik,
- Untersuchung der Veränderung kutikularer Wachse auf mechanische Verwundung des Blattgewebes am Beispiel des Kirschlorbeers,
- Untersuchung von Wundheilungs- oder Abwehrprozessen der epikutikulären Blattwachse des Kirschlorbeers nach Pathogenbefall.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Kombinierte Oberflächenanalytik aus FT-IR und MALDI-TOF-MS

Die Analyse der lokalen Verteilung biologisch aktiver Verbindungen im Organismus ist von essentieller Bedeutung für das Verständnis und die Interpretation ökologischer und biologischer Prozesse. Um Funktionsmechanismen der pflanzlichen Kutikula, Prozesse ihrer Biosynthese und die Rolle in der Pflanzenabwehr besser verstehen zu können, ist neben der qualitativen Zusammensetzung der sie bildenden Lipide auch deren Verteilung auf der Blattoberfläche von entscheidender Bedeutung. Durch die Kombination von Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS wurde am Beispiel des Kirschlorbeers (*Prunus laurocerasus* Caucasica) eine Analysemethode zur Untersuchung der epikutikularen Blattwachse entwickelt.

3.1.1 Entwicklung eines geeigneten Probenträgers

Für die Transmissions-FT-IR-Spektroskopie muß die entsprechende Probe auf ein Trägermaterial aufgebracht werden, das ohne Eigenabsorption im Bereich der Infrarotstrahlung einsetzbar ist. Dafür eignen sich insbesondere Substrate wie Kaliumbromid (KBr), Bariumfluorid (BaF₂) oder Zinksulfid (ZnS), wobei ZnS aufgrund seiner Unlöslichkeit in Wasser bevorzugt eingesetzt wird. Zinksulfid-Fenster werden in der IR-Spektroskopie für Transmissionsmessungen verwendet und sind kommerziell erhältlich. Die Unempfindlichkeit dieses Materials gegenüber Wasser und organischen Lösungsmitteln ermöglicht die Reinigung und Wiederverwendung.

Das Zentrum des hier entwickelten Probenträgers bildete ein kreisförmiges ZnS-Fenster mit einem Durchmesser von 20,0 mm.

Für eine exakte Positionsbestimmung der zu untersuchenden Probenflächen in den Imaging-Experimenten war ein Raster bzw. ein Koordinatensystem als lokaler Bezugspunkt notwendig.

Die Applikation eines solchen Rasters wurde in Kooperation mit dem Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH (IFW, Jena) über Laserbearbeitung erprobt. Das Zinksulfidmaterial hielt dabei dem Laserbeschuss nicht stand, Mikrorisse und Splitterung des Substrates ließen keine erfolgreiche Bearbeitung zu. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT, Jena) wurde ein photolithographisches Ätzverfahren entwickelt, mittels dessen ein solches Raster unter Erhalt der Transparenz des ZnS-Substrates erfolgreich aufgebracht werden konnte [Abb. 7A]. Um die größtmögliche ZnS-Substratfläche lokal erfassen zu können, wurde ein Raster mit der Fläche von 14 x 14 mm und einer Kantenlänge von 1,0 mm gewählt. Dabei wurde das Rastersystem so erstellt, dass dessen Mittelpunkt im Zentrum des ZnS-Fensters lag [Abb. 7B].

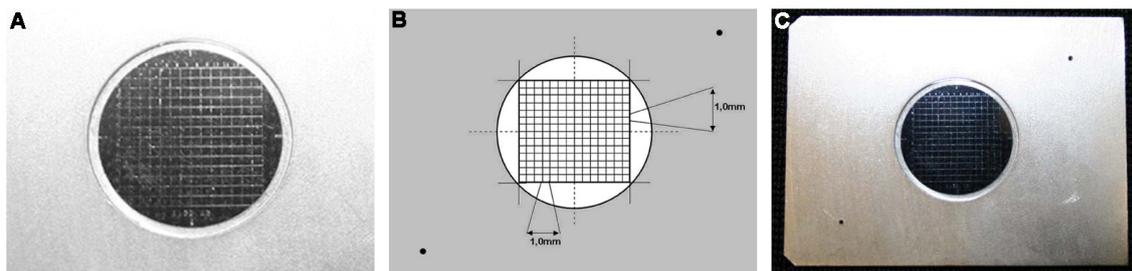


Abb. 7: Aufbau des entwickelten Probenträgers. A) Raster auf ZnS-Fenster, B) schematische Darstellung des Probenträgers, C) Probenträger aus ZnS-Substrat und Stahlrahmen.

Für die Einbringung in das MALDI-TOF-Instrument war dieses ZnS-Fenster zusätzlich in einen Rahmen aus magnetisierbaren Edelstahl eingebettet, der die vertikale Probenposition im Gerät ermöglichte [Abb. 7C]. Das eingesetzte MALDI-TOF-Gerät nutzte den Mittelpunkt des Probentargets als Bezugspunkt für die Trägerpositionierung. Deshalb waren sowohl auf dem Stahlrahmen als auch dem ZnS-Substrat Positionsmarkierungen aufgebracht, die ein exaktes Ausrichten des Zinksulfidfensters auf das Zentrum des Stahlrahmens ermöglichten [Abb. 7B, gestrichelte Linien]. Eine kreisrunde Senkbohrung in der Mitte des Stahlrahmens gewährleistete eine homogene Probenträgerdicke, die gerätebedingt auf 2,2 mm maximal begrenzt war. Die in der Trägerdiagonale befindlichen Positionslöcher waren kommerziellen Probentargets des hier genutzten Gerätes angepasst.

3.1.2 Isolation der Blattwache unter Erhalt der räumlichen Verteilung

Aufgrund des nicht transparenten, zellulären Hintergrundes der Blattstruktur sind Transmissionsmessungen direkt am biologischen Material nicht möglich, sondern verlangen eine entsprechende Probenvorbereitung. Dies kann die isolierte Gewinnung der Kutikula oder der Blattlipide sein.

Im Fokus dieser Arbeit standen die Blattwache des Kirschlorbeers (*Prunus laurocerasus* Caucasica), die in einer modifizierten Methode basierend auf der *kryo-adhesiven* Extraktion von Epikutikularwachsen nach Ensikat *et al.*^[92] und Jetter *et al.*^[18] isoliert wurden.

Dazu wurde ein Tropfen eines Transfermediums, das die Wachsschicht bedecken, aber nicht lösen sollte, auf die zu untersuchende Blattoberfläche gegeben und das ZnS-Fenster des Probenträgers unter Vermeidung von Luftbläschen auf die Blattfläche aufgebracht [Abb. 8A]. Destilliertes Wasser wurde als Transfermedium verwendet, da sich aufgrund der Polaritätsunterschiede die Blattwache darin nicht lösen. Unter Fixierung mit einer Pinzette wurde diese Anordnung für etwa 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht [Abb. 8B] und anschließend das Blattmaterial umgehend vom Probenträger abgezogen. Die so in die Eisphase eingebettete Wachsschicht befand sich als Negativabdruck der Blattoberfläche auf dem ZnS-Fenster und konnte nach dem Trocknen ohne Vorbehandlung in der FT-IR-Analyse eingesetzt werden [Abb. 8C].



Abb. 8: Darstellung des *kryo-adhesiven* Entwachsens der Blattoberflächen: A) Auftragen des Wassers zum Einbetten der epikutikularen Wachskristalle. B) Tauchen des fixierten Probenträgers mit Blattmaterial in flüssigen Stickstoff, C) nach Verdunsten des Wassers auf dem ZnS-Fenster verbliebener Negativabdruck der Wachoberfläche.

Mittels dieser *kryo-adhesiven* Methode ließen sich bei einmaliger Anwendung bis zu 80 % der epikutikularen Wachse gewinnen^[18].

Die Vollständigkeit des Entwachsens wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Abbildung 9 zeigt die adaxiale Blattoberfläche des Kirschlorbeers vor und nach dem *kryo-adhesiven* Oberflächen-Stripping sowie den resultierenden Abdruck auf dem ZnS-Substrat.

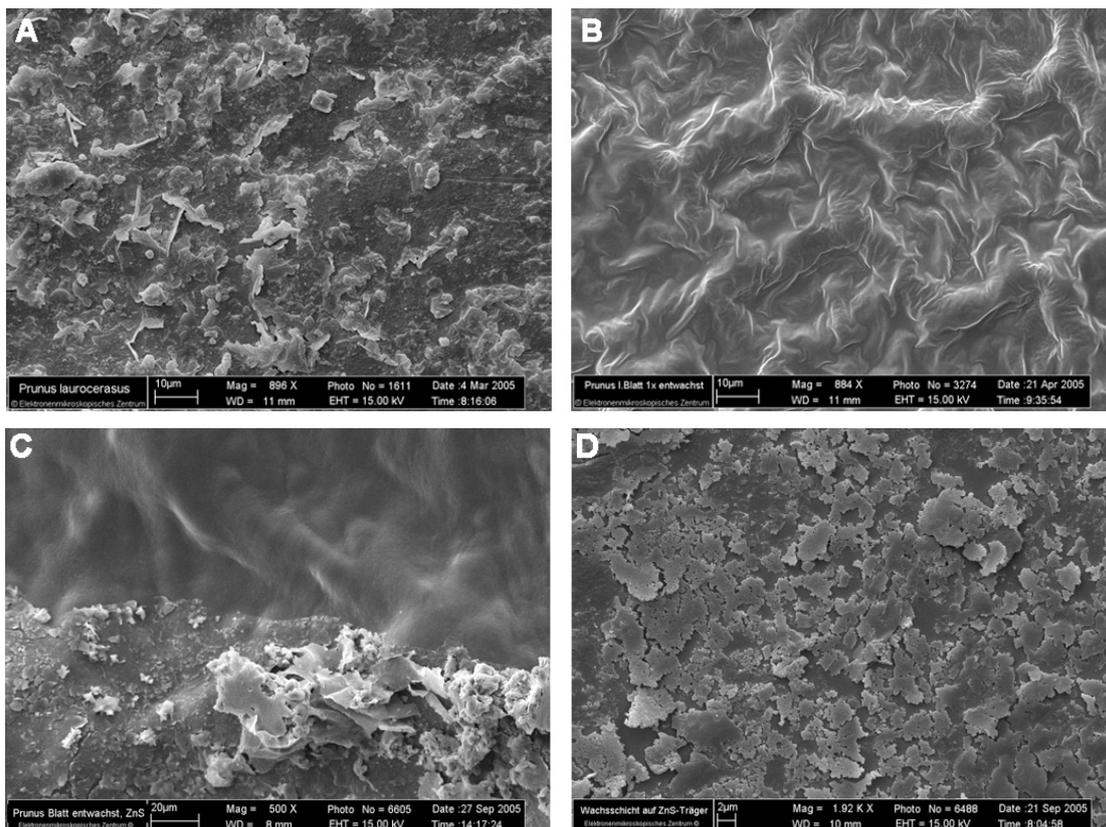


Abb. 9: REM-Aufnahme der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers: A) unbehandelte Blattoberfläche, B) Blattoberfläche nach einmaliger *kryo-adhesiver* Extraktion, C) Grenzfläche zwischen entwachster (obere Bildhälfte) und unbehandelter (untere Bildhälfte) Blattoberfläche, D) Negativabdruck der Wachsoberfläche auf dem ZnS.

Wie den REM-Aufnahmen zu entnehmen war, bestand die kutikulare Wachsschicht des Kirschlorbeers aus einer amorphen Wachsschicht und darauf befindlichen Kristalloiden verschiedener Größe [Abb. 9A].

Mittels der *kryo*-Extraktion konnte bei einmaliger Anwendung neben den äußeren Kristalloiden auch die darunter befindliche Wachsschicht quantitativ entfernt werden [Abb. 9B & C] und wurde als Negativabdruck auf dem Probenträger erhalten [Abb. 9D].

Die dreidimensionale Oberflächenanordnung der Wachse und besondere Strukturen, die durch das unter der Wachsschicht befindliche Blattgewebe bestimmt waren, blieben ebenfalls erhalten, wie am Beispiel der Blattadern [Abb. 10A & B] und Spaltöffnungen des Kirschlorbeers gezeigt werden konnte [Abb. 10C & D].

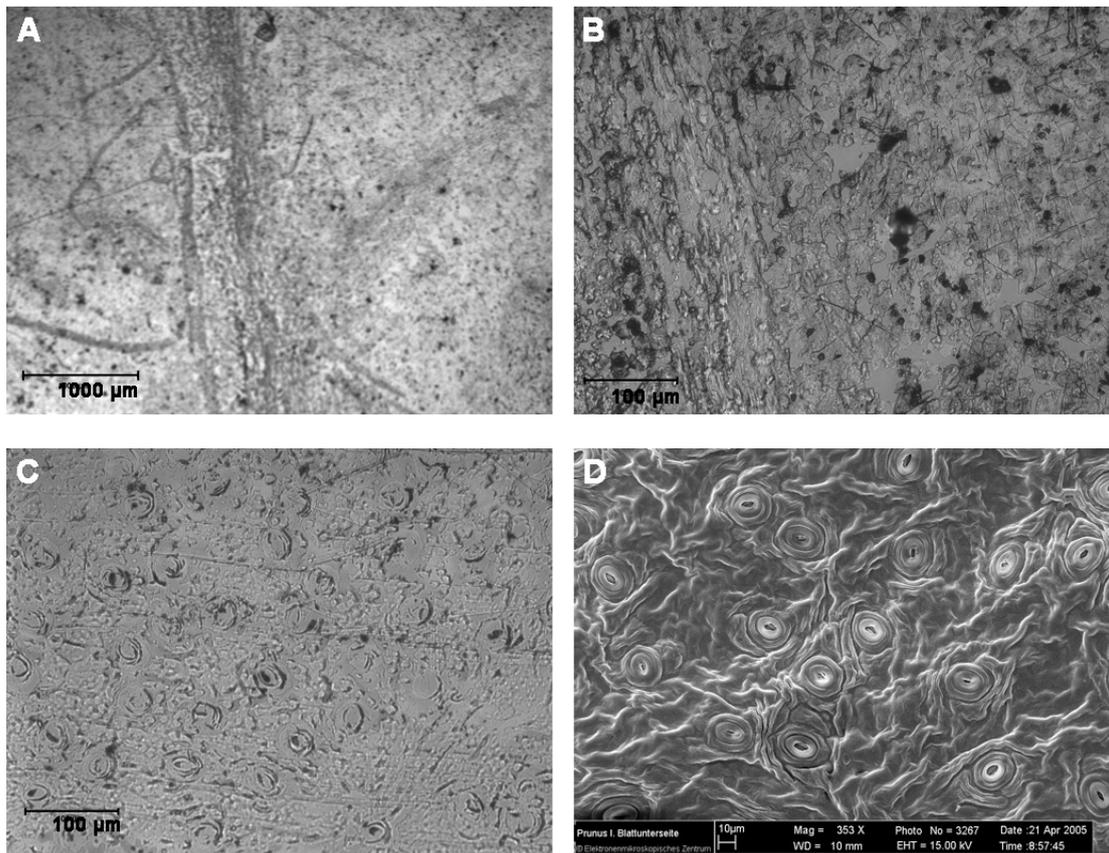


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen epikutikularer Wachsabdrücke des Kirschlorbeers auf dem ZnS-Substrat: A) *kryo-adhesiv*-Abdruck der adaxialen Blattoberfläche mit Haupt- und Seitenader, B) vergrößerte Darstellung des Abdrucks der Hauptader (linke Bildseite) und der Lamina (rechte Bildseite), C) *kryo-adhesiv*-Abdruck und D) REM-Aufnahme der abaxialen Blattoberfläche mit den Strukturen der Spaltöffnungen.

Die erhaltenen Wachsabdrücke auf dem Probenträger konnten bis zur weiteren Untersuchung in einem Exsikkator aufbewahrt werden, womit sich der augenblickliche Zustand des pflanzlichen Wachssystems quasi konservieren ließ. Im Falle der direkten Verwendung des Blattmaterials wäre dies ohne Alterung und Veränderung der Zusammensetzung nicht möglich gewesen. Ebenso konnten gegenüber der direkten Analyse am Blattgewebe durch die Trennung der epikutikularen Wachse von ihrem zellulären Hintergrund Veränderungen der Probe durch das Hochvakuum des MALDI-TOF-Gerätes vermieden werden.

3.1.3 Transmissions-FT-IR-Spektroskopie

Die über die Methode des *kryo-adhesiven* Oberflächen-Strippings gewonnenen Epikutikularwachse ließen sich ohne weitere Vorbehandlungen infrarot-spektroskopisch untersuchen. Der Vorteil der Transmissions-FT-IR gegenüber Reflexionsmessungen zeigte sich beim Vergleich der FT-IR-Spektren der epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers [Abb. 11].

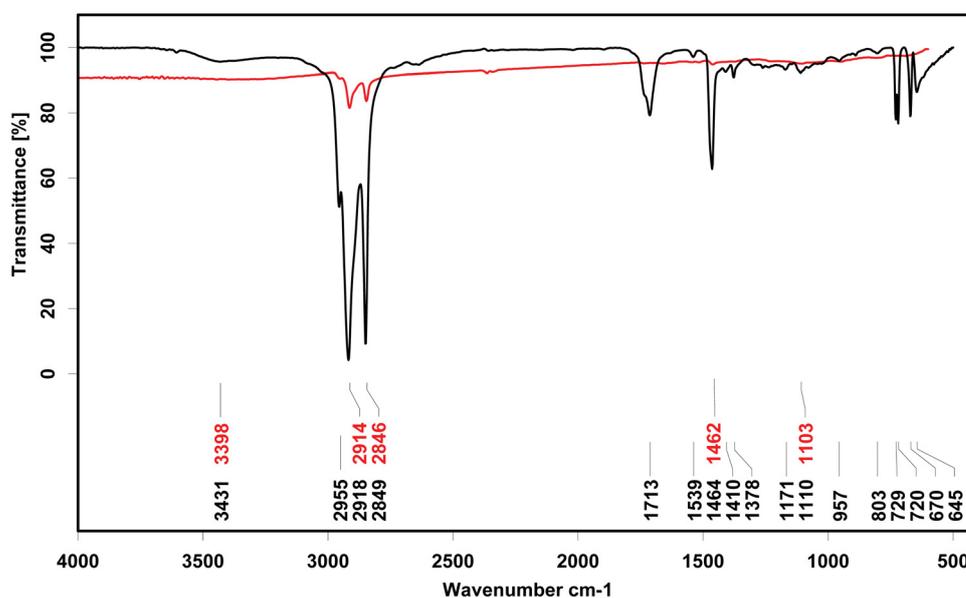


Abb. 11: Vergleich zwischen Transmissions- und Reflexions-FT-IR: Reflexionsspektrum der epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers nach direkter Messung am Blattmaterial (rot) und Transmissionsspektrum des *kryo*-Abdrucks auf dem ZnS-Fenster (schwarz), jeweils 50 Scans wurden pro Spektrum akkumuliert.

Trotz vergleichbarer Messparameter und Detektorempfindlichkeit waren die Signalintensitäten im Transmissionsspektrum wesentlich höher und ermöglichten die differenzierte Detektion einer größeren Anzahl von Signalen. Die Auswertung der Carbonylschwingungen, der Streckschwingungen von Estern oder Alkoholen bzw. isolierter Deformationsschwingungen der CH-Bindungen waren im Reflexionsmodus nicht möglich.

Zur Bestimmung substanzspezifischer Absorptionssignale für die späteren Imaging-Experimente wurden die Spektren von Referenzverbindungen aufgenommen. Als solche Referenzen wurden Verbindungen gewählt, die hauptsächlich Stoffklassen natürlicher Blattwaxse repräsentierten. Dies waren Tetracosan (CH) als langkettiger Kohlenwasserstoff, n-Hexacosanol (OH) als primärer Alkohol, Hexacosansäure (FS) als VLCFA und Eicosansäureeicosylester (AE) als Wachsester. Tabelle 1 zeigt die intensivsten Absorptionen der jeweiligen Referenzverbindungen und die zugrunde liegenden Schwingungen.

$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]	CH	OH	FS	AE	Referenzmix
~3300	-	ν OH	-	-	ν OH
3029	-	-	ν OH	-	-
2967-2953	ν_{as} CH ₃				
2918-2916	ν_{as} CH ₂				
2849	ν_s CH ₂				
1735	-	-	-	ν C=O	ν C=O
1705	-	-	ν C=O	-	-
1471-1463	δ_{as} CH ₃				
1438	δ_{as} CH ₃				
1370	δ_s CH ₃				
1176	-	-	-	ν_{as} C-OC	ν_{as} C-OC
1123	-	ν C-O	ν C-OH	-	ν C-OC
1073	-	ν C-OH	-	-	-
934	-	-	δ OH	-	δ OH
725,671	ρ CH ₂				

Tab. 1: Charakteristische Absorptionen der Referenzverbindungen im FT-IR-Spektrum sowie die zugrundeliegenden Schwingungen entsprechender funktioneller Gruppen.

Abbildung 12 zeigt die Transmissions-FT-IR-Spektren für ein äquimolares Gemisch von Tetracosan, n-Hexacosanol, Hexacosansäure und Eicosansäureeicosylester im Konzentrationsbereich von 10 mM bis 0,001 mM.

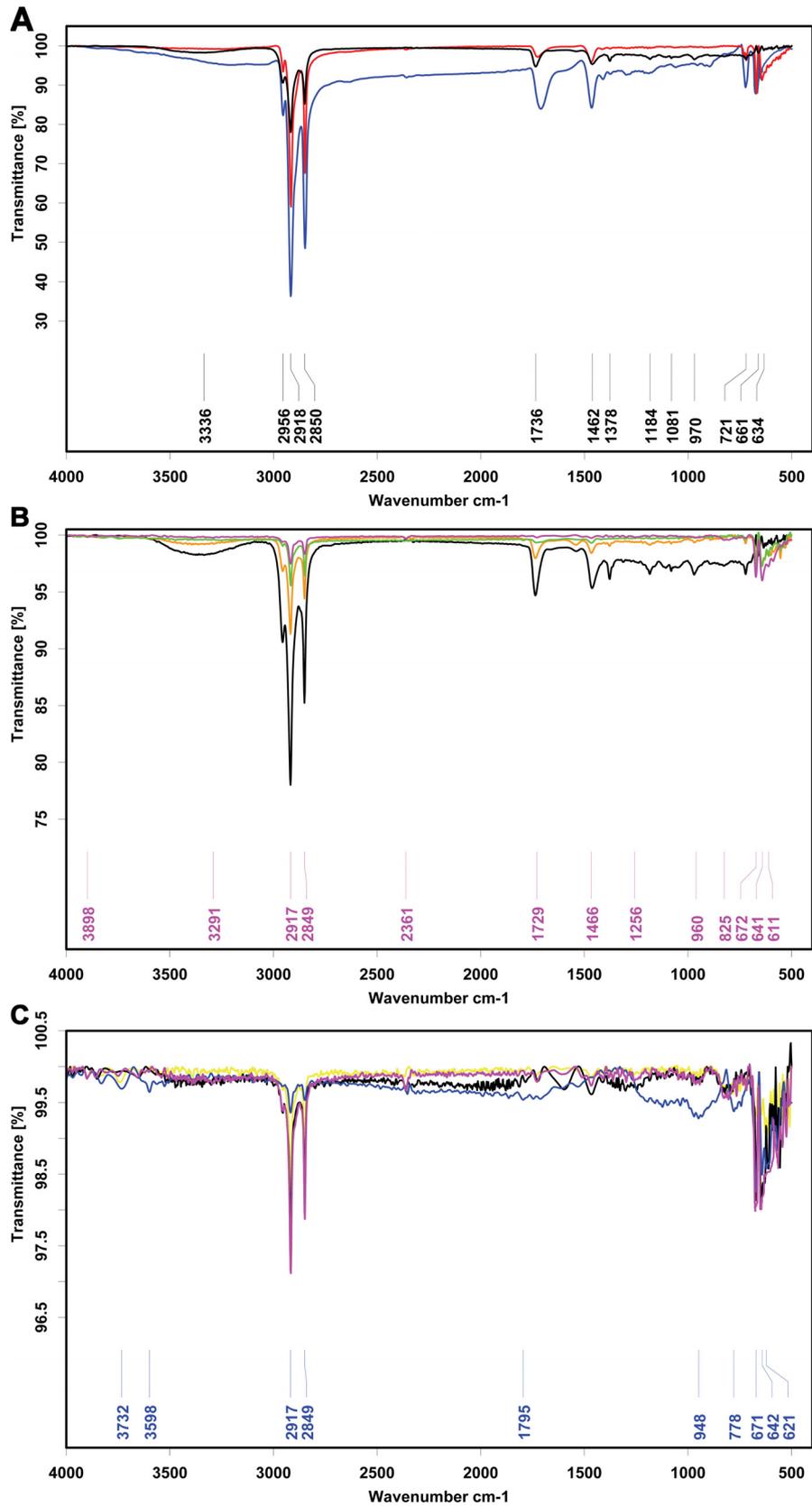


Abb. 12: Spektren des Referenzgemisches mit Konzentrationen [mM] A) 10 (blau), 1 (rot), 0,5 (schwarz), B) 0,5 (schwarz), 0,2 (orange), 0,1 (grün), 0,05 (magenta), C) 0,05 (magenta), 0,02 (schwarz), 0,01 (gelb), 0,001 (blau).

Über den betrachteten Konzentrationsbereich von 0,001 mM bis zu 10 mM zeigten die CH₂-Gruppen die stärksten Absorptionen um 2918 cm⁻¹ und 2849 cm⁻¹, und auch bei 0,001 mM konnte noch zwischen symmetrischer und asymmetrischer Streckschwingung differenziert werden. Die Carbonylschwingung um 1720 cm⁻¹ war bei dieser Konzentration ebenso wie die Streckschwingung der OH-Bindung der Alkohole nicht mehr detektierbar. Bei einer Konzentration von 0,01 mM traten beide aber als isolierte Banden im Spektrum auf. Auch die Deformationsschwingung der CH₂-Gruppen um 1460 cm⁻¹ konnte bei dieser Konzentration im Spektrum beobachtet werden.

Für alle betrachteten Substanzklassen zeigten die Streckschwingungen der Methylengruppen die intensivsten Absorptionen (2918 cm⁻¹, 2849 cm⁻¹). Alle Signale reiner Kohlenwasserstoffe waren auch in den Spektren der langkettigen Referenzverbindungen stark vertreten (2967 cm⁻¹, 1465 cm⁻¹, 1370 cm⁻¹). Aus diesem Grund konnten Alkane nicht isoliert anhand einer spezifischen Absorption identifiziert werden, die Intensität der CH₃/CH₂-Streckschwingung konnte dafür aber als Maß für die Verteilung des gesamten Wachsgemisches eingesetzt werden.

Für die Quantifizierung der CH₃/CH₂-Absorption musste zuvor über den betrachteten Konzentrationsbereich kalibriert werden. Dafür wurden von dem äquimolaren Gemisch der Referenzverbindungen im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 0 mM Transmissionsspektren aufgenommen und die Integrale der CH₃/CH₂-Absorptionen ausgewertet.

In dem hier betrachteten Bereich zeigten die Konzentration des Referenzgemisches (angegeben als Oberflächenbedeckung, µg cm⁻²) und die Intensität der CH₃/CH₂-Absorptionen (Integral der Absorptionen) gute Linearität, wie dem ermittelten Korrelationskoeffizienten von 0,9882 zu entnehmen war.

In Tabelle 2 sind die verwendeten Konzentrationen des Referenzgemisches bzw. die daraus resultierende Oberflächenbedeckung sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Signalintegrale dargestellt. Abbildung 13 zeigt die entsprechende lineare Regression.

C_{Referenz} [mM]	Oberflächenbedeckung [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	Integral (MW \pm SD)
0,000	0,000	0,0085 \pm 0,0071
0,001	0,218	0,0573 \pm 0,0084
0,020	4,357	0,2358 \pm 0,0208
0,050	10,893	0,3494 \pm 0,0132
0,100	21,786	0,9985 \pm 0,2958
0,200	43,571	1,5190 \pm 0,0452
0,500	108,927	4,1028 \pm 0,1611
1,000	217,856	6,1280 \pm 0,8147
Korrelationskoeffizient	0,9882	-

Tab. 2: Konzentrationen, Oberflächenbedeckung (Auftragungsvolumen 1 μl , Durchmesser Auftragsfläche 1 mm) sowie die resultierenden Signalintegrale (Mittelwerte und Standardabweichung) für die Kalibration der CH_3/CH_2 -Streckschwingung.

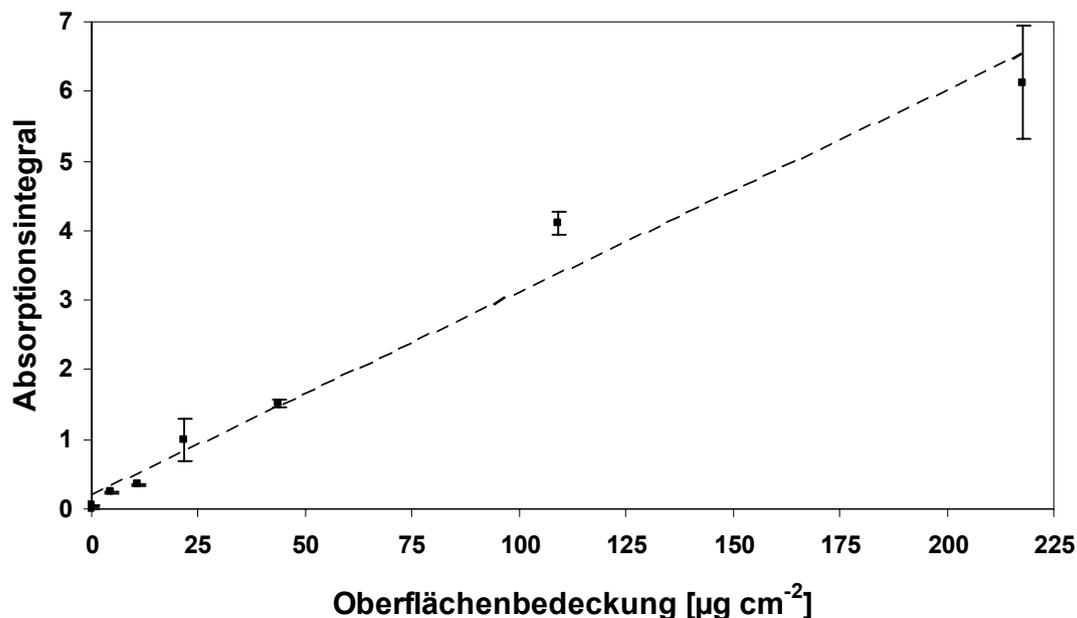


Abb. 13: Absorptionsintegrale der CH_3/CH_2 -Streckschwingung und lineare Regression für das Referenzgemisch ($n=4$) im Bereich von 0 bis 217,856 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (0 bis 1 mM).

Gegenüber den Alkanen ließen sich Alkohole spezifisch an der Streckschwingung der OH-Gruppe im Bereich um 3300 cm^{-1} erkennen. Die Streckschwingung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Einfachbindung um 1100 cm^{-1} trat im Referenzgemisch weniger intensiv auf als im Spektrum des reinen Alkohols. Aufgrund des isolierten Wellenzahlenbereichs der OH-Schwingung, in dem keine Absorptionen anderer typischer Wachskomponenten auftraten, wurde die Streckschwingung der OH-Gruppe als Identifikationsmerkmal für die Alkohole im Wachsgemisch verwendet.

Die schwache Intensität der OH-Schwingung insbesondere bei niedrigen Konzentrationen führte zu einem stark verbreiterten Signal mit geringer Amplitude. Das erschwerte die Quantifizierung dieses Signals. Als weitere Störung trat ebenfalls das in der Luft gebundene Wasser in Erscheinung. Trotz Einsatz der softwareeigenen „Atmosphärischen Kompensation“, welche Einflüsse von CO₂ und Wasser auf die Spektren minimierte, konnte keine geeignete Kalibration des OH-Signals erstellt werden, die auf die über eine Dauer von 10 Stunden aufgenommenen Imaging-Messungen anwendbar war.

Die relativ geringe Signalamplitude wie auch die Überlagerung von benachbarten Absorptionsbanden verhinderten auch im Falle der Carbonylschwingungen eine quantitative Auswertung. So zeigten Fettsäuren und Ester für die Carbonylgruppen eine Absorption um 1700 cm⁻¹, wobei das Estersignal gegenüber dem der freien Fettsäure hypsochrom (zu höherer Wellenzahl) verschoben war. Gegenüber den Einzelsubstanzen beobachtete man bei dem Referenzgemisch eine verbreiterte Carbonylbande bzw. Signale mit Schultern, was auf der Überlagerung der Absorptionen von Ester und Säure beruhte. Im Falle der Alkylester und Fettsäuren ließ dies nur bedingt eine Trennung beider Substanzklassen anhand der Carbonylstreckschwingung zu [Abb. 14]. Der Wellenzahlenbereich von 1700-1750 cm⁻¹ wurde aber zur gemeinsamen Lokalisierung aller Carbonylverbindungen im Wachsgemisch verwendet.

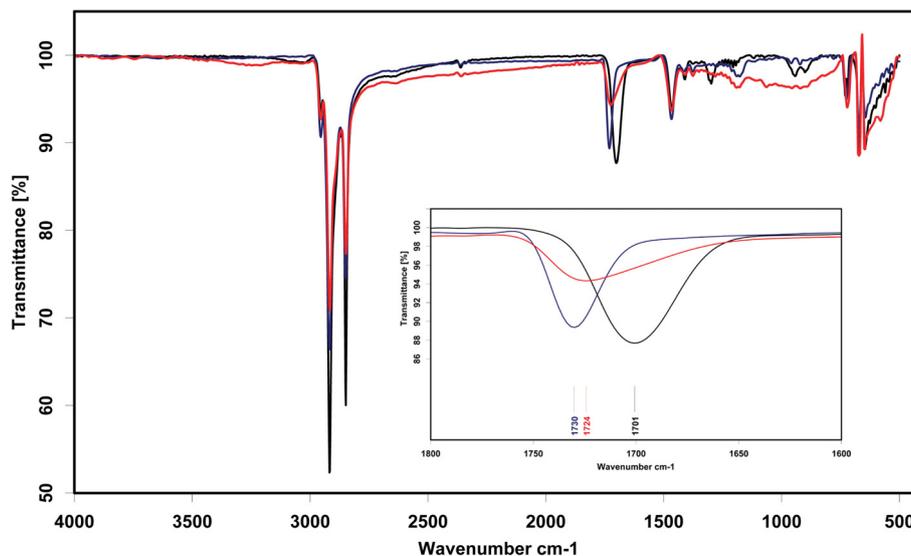


Abb. 14: Transmissions-FT-IR-Spektren von Hexacosansäure (schwarz), Eicosansäureeicosylester (blau) und Referenzgemisch (rot). Das Inset zeigt den Bereich von 1800-1600 cm⁻¹.

Eine Begrenzung des zu messenden Wellenzahlenbereiches sowie die Erhöhung der spektralen Auflösung konnten die Trennung beider Signale verbessern, erhöhten aber gleichzeitig auch die Messdauer.

In Kombination mit den Informationen aus der MALDI-TOF-MS konnten beide Substanzen bzw. -klassen anhand ihrer Molekülmassen voneinander getrennt analysiert und die Verteilung beider Verbindungen individuell betrachtet werden. Ebenso konnten die Kohlenwasserstoffe, deren Oberflächenverteilung aufgrund fehlender individueller Signale über die Imaging FT-IR allein nicht zugänglich war, anhand ihrer Molekülmassen in der Imaging MALDI-TOF-MS untersucht werden.

3.1.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-Massenspektrometrie beruht auf der Ionisierung des Analyten durch gepulsten Laserbeschuss. Die Applikation einer Matrix, oft 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder von ihr abgeleitete Derivate^[129, 139], erleichtert die Ionisation der Probe und die Bildung von Adduktionen. Diese Adduktionen besitzen meist die Masse $[M+X]^+$, mit M als Molekül und X als Matrixion. Die Massenseparation und -detektion der erzeugten Ionen erfolgt üblicherweise über ein Time-of-Flight-Massenspektrometer (TOF). Die MALDI-TOF-MS weist gegenüber der EI-MS einen größeren dynamischen Massenbereich von 5 bis über 300.000 Da auf und ist damit sowohl für die Analyse kleiner (Bio)Moleküle als auch komplexer, polymerer Strukturen wie Peptide oder Proteine geeignet^[126, 129].

Die Wahl einer geeigneten Matrix wurde maßgeblich durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten bestimmt. Da im Falle epikutikularer Blattwachse vorwiegend Gemische langkettiger, unpolarer, aliphatischer Verbindungen untersucht wurden, musste die entsprechende Matrix zur Ionisation reiner Kohlenwasserstoffe befähigt sein. Silbersalze (Silbernitrat^[140], Silbertrifluoracetat^[141]) und atomares, kolloidales Silber^[142] waren als Matrix zur Ionisation von Kohlenwasserstoffen beschrieben. Da das verwendete Kolloid (20 ppm, 0,65 nm mittlere Partikelgröße) eine Dispersion des Silbers in Wasser darstellte, sollte der hydrophile Charakter des Kolloids beim Auftragen ein Anlösen und Vermischen der Blattwachse verhindern.

Abbildung 15 zeigt das MALDI-TOF-Massenspektrum unter Verwendung der Ag-Kolloid-Matrix für das in der FT-IR-Analytik eingesetzte Referenzgemisch. Wie aus dem Spektrum ersichtlich war, entstanden mit allen betrachteten Substanzklassen Adduktionen der Massen $[M+^{107}\text{Ag}]^+$ bzw. $[M+^{109}\text{Ag}]^+$ im Verhältnis 1,1:1, entsprechend dem natürlichen Isotopenverhältnis des Silbers.

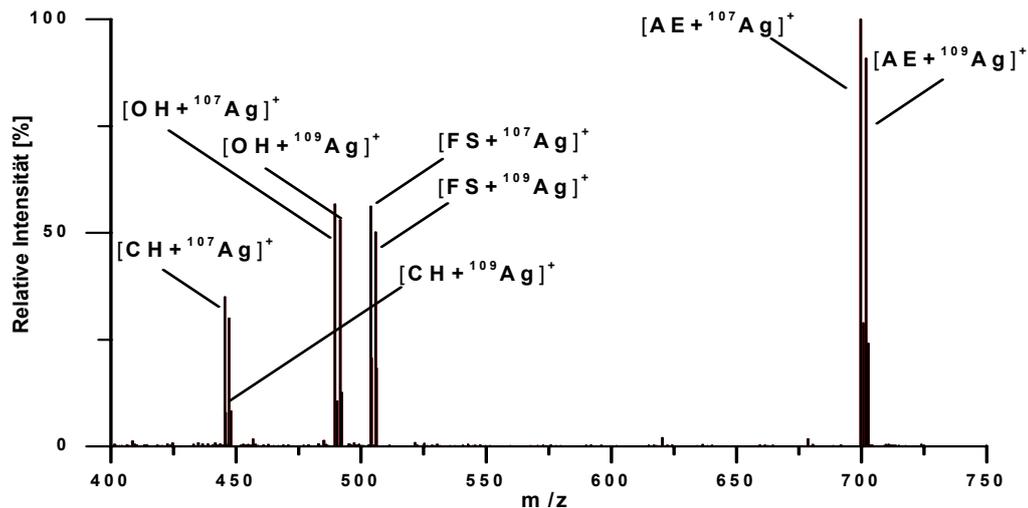


Abb. 15: MALDI-TOF-Massenspektrum des Referenzgemisches aus Hexacosanol (OH), Hexacosansäure (FS), Tetracosan (CH) und Eicosansäureeicosylester (AE) unter Verwendung der Ag-Kolloid-Matrix auf dem ZnS-Träger.

Das Auftreten zweier Matrixaddukte, bedingt durch die natürliche Isotopenverteilung des Silbers, würde im Falle komplexer Probengemische die Interpretation der Spektren erheblich erschweren und bei Verbindungen mit einer Massendifferenz von 2 Da keine eindeutige Zuordnung der Signale mehr gestatten.

Einen weiteren Nachteil stellte die wässrige Lösung bezüglich einer homogenen Verteilung der Matrix dar. Durch den extremen Polaritätsunterschied zwischen Probe und Kolloid, bzw. der Oberflächenspannung der Matrixlösung, kam es beim Aufsprühen auf die Probe zur Tröpfchenbildung, was beim Trocknen zu einer ungleichen Verteilung der Silberpartikel auf der Probenfläche führte.

Da die Dicke der Matrixschicht entscheidend Einfluss auf die Intensität der Probensignale übte, hätten Inhomogenitäten in der Beschichtung zu verfälschten Signalintensitäten und daraus resultierend zu falschen Oberflächenbildern geführt.

Als Alternative zu dem Silberkolloid wurde Lithium-2,5-dihydroxybenzoat (LiDHB) als Matrix für die MALDI-Analyse unpolarer Insektenkutikulas beschrieben^[143, 144]. LiDHB bildete mit gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffketten von bis zu 70 C-Atomen stabile Addukte der Struktur $[M+Li]^+$.

Lithium kommt ebenfalls in zwei natürlichen Isotopen mit 6,02 und 7,02 Da vor, allerdings liegt der natürliche Anteil des leichteren Isotops bei nur rund 8 %. ⁷Lithiumhydroxid Monohydrat (⁷LiOH·H₂O) war mit 99 % Isotopenreinheit kommerziell erhältlich und wurde zur Darstellung der ⁷LiDHB-Matrix verwendet. Die Synthese erfolgte in einem modifizierten Protokoll in Anlehnung an die Methode von Cvačka *et al.* (2003)^[143] ausgehend von DHB und ⁷LiOH·H₂O in Methanol. Das ⁷LiDHB wurde in einem Methanol/Aceton-Gemisch (1:9) gelöst und in einer Konzentration von 10 mg ml⁻¹ als Matrix für die MALDI-TOF-MS eingesetzt. Wie Abbildung 16 zeigt, bildete das ⁷LiDHB mit allen betrachteten Substanzklassen entsprechende intensitätsstarke Matrixaddukte.

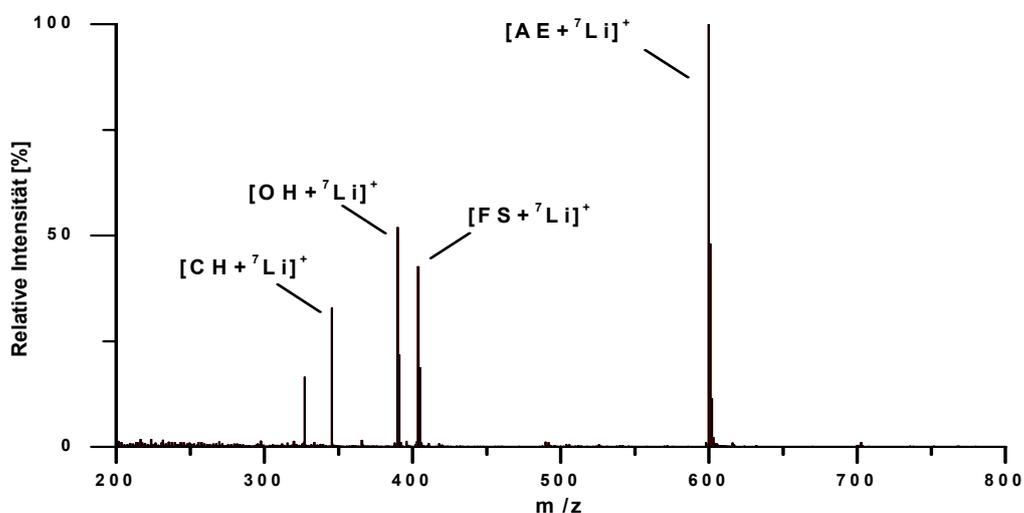


Abb. 16: MALDI-TOF-Massenspektrum des Standardgemisches (10 mM) aus Hexacosanol (OH), Hexacosansäure (FS), Tetracosan (CH) und Eicosansäureeicosylester (AE) unter Verwendung der ⁷LiDHB-Matrix auf dem ZnS-Träger.

Üblicherweise erfolgt die Applikation der Matrix für die MALDI-TOF-MS durch Mischen von Analyt und Matrix in einem definierten Konzentrationsverhältnis und durch gleichzeitiges Auftragen auf das Probenziel. Diese Art der Co-Applikation gewährleistet eine gewisse Probenhomogenität und minimiert Einflüsse ungleichmäßiger Matrixverteilung auf Intensität und Qualität der Spektren^[143-145].

Im Falle der hier zu untersuchenden Oberflächenabdrücke war eine solche Co-Applikation jedoch nicht möglich, da diese die dreidimensionale Struktur der Blattwachse durch den Einsatz organischer Lösungsmittel zerstört hätte. Anstelle dessen wurde der Probenabdruck vor der MALDI-TOF-MS-Analyse mit der entsprechenden Matrixlösung besprüht. Um Inhomogenitäten in der Matrixschicht zu minimieren, wurde die Lösung unter Verwendung einer sehr fein zerstäubenden Airbrush-Pistole und Argon als Trägergas aus ca. 10 cm Distanz zum Probenträger aufgebracht. Ein weiterer Vorteil der Verwendung des $^7\text{LiDHB}$ war dessen Löslichkeit in einem polaren Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Aceton. Aufgrund der feinen Zerstäubung und der Leichtflüchtigkeit der eingesetzten Lösungsmittel konnte eine Tropfenbildung auf dem Probenträger minimiert und die Matrix als feiner, kristalliner Überzug aufgetragen werden.

Um die Anwendbarkeit der $^7\text{LiDHB}$ -Matrix auf das pflanzliche Wachssystem, die Applikation mittels Airbrush-Pistole und die Verwendung des entwickelten Proben Targets zu testen, wurden repräsentative Referenzverbindungen mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Es wurden die gleichen Verbindungen wie in der FT-IR verwendet. Neben den Einzelverbindungen wurde ebenfalls ein äquimolares Gemisch aller vier Referenzen analysiert, um Einflüsse verschiedener Substanzklassen auf die Signalintensitäten zu untersuchen. Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und Korrelationskoeffizienten der relativen Intensitäten für das Referenzgemisch ($n=4$).

c [mM]	relative Intensität (Mittelwert \pm Standardabweichung)			
	OH	FS	CH	AE
1,0	15375 \pm 998	12495 \pm 928	5875 \pm 425	31500 \pm 1951
0,5	8745 \pm 497	4620 \pm 849	3783 \pm 436	19750 \pm 624
0,2	4883 \pm 460	2173 \pm 426	1792 \pm 99	11725 \pm 1500
0,1	3858 \pm 324	1688 \pm 126	896 \pm 70	8025 \pm 1204
0,05	1560 \pm 242	770 \pm 104	-	4928 \pm 177
0,02	713 \pm 114	357 \pm 118	-	2039 \pm 130
0,01	146 \pm 33	116 \pm 15	-	350 \pm 114
Korr.koeffizient	0,9875	0,9893	0,9895	0,9809

Tab. 3: Relative Intensitäten, Standardabweichungen und Korrelationskoeffizienten für die MALDI-TOF-MS des äquimolaren Referenzgemisches, ($n=4$).

Alle vier Substanzen zeigten sowohl als Einzelmessung (Daten und Grafiken siehe Anhang) als auch als Gemisch im betrachteten Konzentrationsbereich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration des Analyten und der Signalintensität, wie den entsprechenden Korrelationskoeffizienten zu entnehmen war. Die Intensitäten der Proben signale variierten dabei zwischen den einzelnen Substanzklassen um bis zu einer Zehnerpotenz. Der Kohlenwasserstoff wies im Vergleich zu den sauerstoffhaltigen Verbindungen die geringsten Signalintensitäten auf und bereits ab einer Konzentration von 0,1 mM konnte kein auswertbares Proben signal mehr detektiert werden.

Der Ester hingegen zeigte bei allen betrachteten Konzentrationen die höchste Signalintensität und im Vergleich zu den anderen Verbindungen auch bei einer verminderten Laserenergie von rund 80 % (126 μ J) intensitätsstarke Adduktionen [Abb. 17]. Das Vorhandensein polarer, funktioneller Gruppen übte also ebenso wie die Molekülgröße entscheidenden Einfluss auf die Ionisierbarkeit des Moleküls.

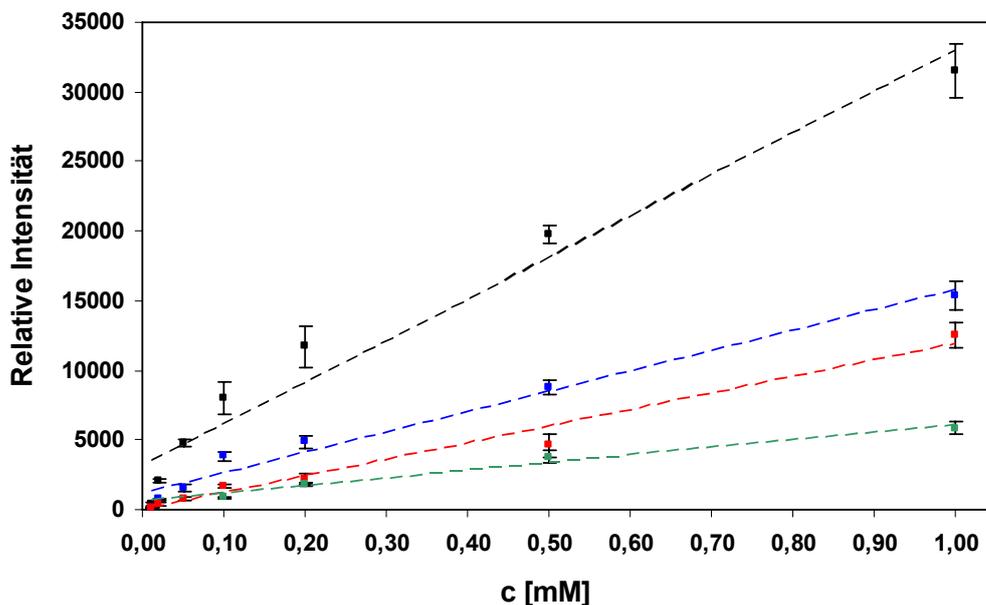


Abb. 17: Relative Intensitäten der ^7Li -Adduktionen und lineare Regression für das Referenzgemisch aus Hexacosanol (blau), Hexacosansäure (rot), Tetracosan (grün) und Eicosansäureeicosylester (schwarz) im Konzentrationsbereich von 1,00 bis 0,01 mM.

Zur Bestimmung der Detektionslimits der jeweiligen Substanzen (LOD, Limit of Detection) wurde die Konzentration ermittelt, bei der das Verhältnis zwischen Proben signal und Messuntergrund (S:N) 3:1 betrug.

Bereits bei einer Konzentration von 0,1 mM zeigte Tetracosan dieses Signal-Rausch-Verhältnis, bei geringeren Konzentrationen konnte kein Probensignal mehr detektiert werden. Das Detektionslimit des Kohlenwasserstoffes betrug somit 100 pmol bzw. 34 ng für einen Probenauftrag (Targetspot) von 0,8 mm² (Durchmesser 1 mm). Die LOD für n-Hexacosanol, Hexacosansäure wie auch Eicosansäureeicosylester lagen bei einer Konzentration von 0,01 mM, was einer Stoffmenge von 10 pmol, das heißt rund 4 ng für n-Hexacosanol und Hexacosansäure bzw. 6 ng für den Ester entsprach.

Bezogen auf eine Targetspotgröße von 0,8 mm² ergaben sich für die hier ermittelten LODs eine Oberflächenbedeckung von 0,49 µg cm⁻² für n-Hexacosanol, 0,51 µg cm⁻² für Hexacosansäure, 0,76 µg cm⁻² für den Alkylester und 4,31 µg cm⁻² für Tetracosan [Tab. 4].

LOD (S:N 3:1)	OH	FS	CH	AE
c [mM]	0,01	0,01	0,1	0,01
n [pmol]	10	10	100	10
m [ng]	4	4	34	6
Bedeckung [µg cm ⁻²]	0,49	0,51	4,1	0,76

Tab. 4: Nachweisgrenzen (Konzentration der Lösungen, applizierten Stoffmengen und Massen) und resultierende Oberflächenbedeckung von Hexacosanol (OH), Hexacosansäure (FS), Tetracosan (CH) und Eicosansäureeicosylester (AE) für die MALDI-TOF-MS.

Die in der Literatur beschriebene Oberflächenbedeckung der epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers lag im Bereich von 13,00 bis 80,00 µg cm⁻² für das Wachsgemisch und im Bereich von 1,00 bis 4,00 µg cm⁻² für individuelle Substanzen^[18]. Die ermittelten LODs für das System aus den vier verschiedenen funktionalisierten Verbindungen lagen also in einem Bereich, der der natürlichen Oberflächenbedeckung der Blattwachse des Kirschlorbeers entsprach. Daher konnte die hier entwickelte MALDI-TOF-MS-Methode auf das komplexe Gemisch epikutikularer Blattoberflächen übertragen werden.

Die quantitative Bestimmung individueller Verbindungen über MALDI-TOF-MS gestaltete sich bei dem hier betrachteten komplexen Probengemisch der Blattwachse schwierig.

Wie bereits bei dem Referenzgemisch beobachtet wurde, übte die Anzahl funktioneller Gruppen im Molekül entscheidenden Einfluss auf die Ionisierbarkeit einer Substanz aus. Auch trat mit steigender Kohlenstoffkette eine höhere Ionisierbarkeit auf, was somit schon innerhalb der homologen Reihe einer Substanzklasse zu Unterschieden in den Signalintensitäten führte. Auch beobachtete man kumulative Effekte auf die Ionisierbarkeit innerhalb einer Probe, die die Signalintensitäten im Gemisch gegenüber denen der Einzelsubstanzen ebenfalls erhöhten.

Neben diesen schon in Einzelmessungen auftretenden Auswirkungen auf die Signalintensitäten einer Probe kam bei den Imaging-Experimenten zusätzlich noch der Einfluss der Matrixverteilung hinzu. Experimentell bedingt war die Dicke der aufgetragenen Matrixschicht nie exakt homogen, was sich ebenfalls auf die Intensität der Probensignale auswirkte. Die Komplexität dieser Einflüsse hätte zur Quantifizierung der Wachssubstanzen einer Kalibration für jede individuelle Verbindung bedurft. Im Falle von Carbonsäuren, Alkylestern und langkettigen Alkoholen kam es zusätzlich noch zu einer Überlagerung der Signale im Spektrum, die sich unter den hier eingesetzten Messbedingungen nicht trennen ließen.

So besaß das ${}^7\text{Li}$ -Adduktion der Hexacosansäure ($\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2+{}^7\text{Li}$, m/z 403,63 Da) annähernd die gleiche Masse wie die entsprechenden Ionen des Heptacosanols ($\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{O}_2+{}^7\text{Li}$, m/z 403,67 Da) bzw. eines aliphatischen Esters mit 26 Kohlenstoffatomen ($\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2+{}^7\text{Li}$, m/z 403,63 Da).

Aus diesen Gründen wurde eine Quantifizierung der epikutikularen Blattwachse des Kirschlorbeers mittels MALDI-TOF-MS im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

3.2 Qualitative und quantitative Analyse der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers

Der Kirschlorbeer (*Prunus laurocerasus* Caucasica) wurde bezüglich seiner Blattwachse als Modellorganismus für den Einsatz der entwickelten Oberflächenanalytik gewählt, da bereits grundlegende Studien an seinen epikutikularen und intrakutikularen Wachsen hinsichtlich Morphologie^[106], Zusammensetzung^[18, 105, 115, 119] und dynamischer Veränderungen während der Blattalterung^[19] durchgeführt wurden. Da die Wachszusammensetzung selbst innerhalb einer Pflanzenspezies bei verschiedenen Unterarten stark variieren kann, wurde vor Einsatz der Oberflächenanalytik das epikutikulare Wachssystem der hier verwendeten Versuchspflanzen mittels GC-MS- und GC-FID-Analytik qualitativ und quantitativ charakterisiert.

3.2.1 Darstellung der Alkylester- und Aldehyd-Referenzen

Die Charakterisierung und Identifikation der Wachszusammensetzung des Kirschlorbeers wurden über die Retentionszeiten und Massenspektren im Vergleich zu entsprechenden Referenzverbindungen durchgeführt.

Für die n-Alkane, Fettsäuren und primären Alkohole waren Referenzsubstanzen im betrachteten Kettenlängenbereich von C₂₀ bis C₃₂ kommerziell erhältlich, die Referenzsubstanzen der Alkoholacetate und Aldehyde wurden synthetisch dargestellt.

Die Acetate der Kettenlängen C₂₀, C₂₄, C₂₆, C₂₈ und C₃₀ wurden durch Veresterung der entsprechenden primären Alkohole mit Acetylchlorid in Essigsäure hergestellt.

Die Aldehyde der Kettenlänge C₂₂, C₂₄, C₂₆, C₂₈ und C₃₀ wurden ausgehend von den entsprechenden primären Alkoholen über die Oxidation mit 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) synthetisiert^[146, 147]. IBX wurde dafür zuvor aus 2-Iodbenzoesäure und Kaliumperoxomonosulfat durch Erhitzen in Wasser generiert^[148].

3.2.2 Qualitative und quantitative Analyse mittels GC-MS und GC-FID

Da in der späteren Oberflächenanalytik ausschließlich die über *kryo-adhesive* Extraktion gewonnenen epikutikularen Wachse untersucht werden sollten, wurden hier ebenfalls nur die epikutikularen Wachse mittels GC-MS qualitativ und quantitativ charakterisiert.

Unter Verwendung runder Metallplättchen mit einem Durchmesser von 23 mm wurden die Wachse des Kirschlorbeers ebenso wie bei der Gewinnung der Oberflächenabdrücke *kryo-adhesiv* extrahiert. Dabei wurde ausschließlich die Lamina adaxialer Blattoberflächen unter Vermeidung der Blattadern extrahiert, da diese aufgrund der ebenen Oberflächenstruktur für eine quantitative Extraktion besonders geeignet war.

Jeweils 30 mit der Wachs-Eis-Phase beladene Metallplättchen wurden mit Dichlormethan extrahiert, n-Eicosan als interner Standard zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden insgesamt vier Wiederholungen mit je 30 Plättchen durchgeführt.

Anhand der Auswaagen der Wachsextrakte und der Größe der entwachsten Blattoberfläche wurde die Oberflächenbedeckung der epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers berechnet. Über den Mittelwert der Auswaagen ($1700 \mu\text{g} \pm 100 \mu\text{g}$) wurde die Oberflächenbedeckung auf $13,89 \mu\text{g cm}^{-2}$ bestimmt, was in Übereinstimmung mit bereits in der Literatur beschriebenen Daten stand^[18]. Für die *kryo-adhesive* Extraktion der Epikutikularwachse unter Verwendung von Wasser als Transfermedium wurde dort eine Oberflächenbedeckung von rund $13 \mu\text{g cm}^{-2}$ angegeben.

Die qualitative Charakterisierung des epikutikularen Wachssystems erfolgte mittels GC-MS und die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren im Vergleich zu Referenzverbindungen und Bibliotheksspektren der NIST-Datenbank identifiziert. Über die via GC-FID ermittelten Peakflächenverhältnisse zwischen Analyt und internem Standard wurden die *kryo*-Extrakte hinsichtlich ihrer quantitativen Zusammensetzung untersucht.

In Übereinstimmung mit der Literatur wurden ausschließlich langkettige, aliphatische Verbindungen identifiziert, wobei die Klasse der n-Alkane (CH) mit Kettenlängen im Bereich C₂₃-C₃₃ den Hauptanteil des Wachsgemisches darstellte (71,3 %, 4,81 µg cm⁻²)^[18].

Die Homologen mit ungeradzahlicher Kettenlänge und einem Maximum bei C₂₉ dominierten dabei. Primäre Alkohole (OH, 17,9 %, 4,59 µg cm⁻²) und Fettsäuren (FS, 10,8 %, 4,49 µg cm⁻²) konnten ebenfalls detektiert werden, Aldehyde (C₂₂-C₃₀) und Alkylacetate (C₂₄-C₃₂) nur in Spuren, d.h. mit weniger als 0,5 %. In allen diesen Substanzklassen dominierten die geradzahlichen Homologen mit einem Maximum bei C₂₆ für die primären Alkohole und C₂₄ für die Fettsäuren [Tab. 5].

Kettenlänge	CH	OH	FS	Aldehyde	Acetate
20	-	0,7	10,4	-	-
21	-	1,3	2,7	-	-
22	-	1,8	8,5	tr.	-
23	tr.	0,5	4,5	-	-
24	1,7	25,4	19,4	tr.	tr.
25	3,8	1,5	4,6	-	-
26	3,3	26,6	16,9	tr.	tr.
27	7,4	1,6	5,2	-	-
28	4,0	14,3	12,8	tr.	tr.
29	42,6	4,1	2,8	-	-
30	3,2	9,3	11,3	tr.	tr.
31	29,2	5,1	-	-	-
32	1,8	7,8	0,7	-	tr.
33	2,8	-	-	-	-
gesamt [%]	71,3	17,9	10,8	-	-
Oberflächenbedeckung [µg cm⁻²]	4,81	4,59	4,49	-	-

Tab. 5: Prozentuale Zusammensetzung der Epikutikularwache des Kirschlorbeers innerhalb der Substanzklassen, prozentuale Zusammensetzung des Gesamtgemisches und resultierende Oberflächenbedeckung. tr. bedeutet <0,5 %.

Die in der Literatur angegebenen Oberflächenbedeckungen der individuellen Substanzklassen stimmten nicht mit den hier ermittelten überein. In der Arbeit von Jetter *et al.*^[18] wurden wahrscheinlich bei der Berechnung der prozentualen Massenzusammensetzung die relativen Molprozent (Mol-%) mit Massenprozenten (Mass-%) gleichgesetzt. Zur Berechnung der Massenprozent müssen aber die molaren Massen jeder einzelnen Verbindung berücksichtigt werden. Ebenso wurden vermutlich auch keine Responsefaktoren berücksichtigt, die aber für die Vergleichbarkeit der Signalintensitäten unterschiedlicher Substanzklassen notwendig waren^[149] (siehe Anhang).

3.2.3 Analyse der Epikutikularwachse mittels FT-IR und MALDI-TOF

Für die späteren Imaging-Experimente an den Abdrücken der Blattoberflächen wurden zuvor die *kryo*-Extrakte des Kirschlorbeers mittels FT-IR und MALDI-TOF-MS untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der qualitativen und quantitativen Wachsanalyse beobachtete man in dem in Abbildung 18 gezeigten Transmissions-FT-IR-Spektrum als intensivste Absorptionen die Signale der CH₃/CH₂-Streckschwingungen (2918 cm⁻¹, 2849 cm⁻¹).

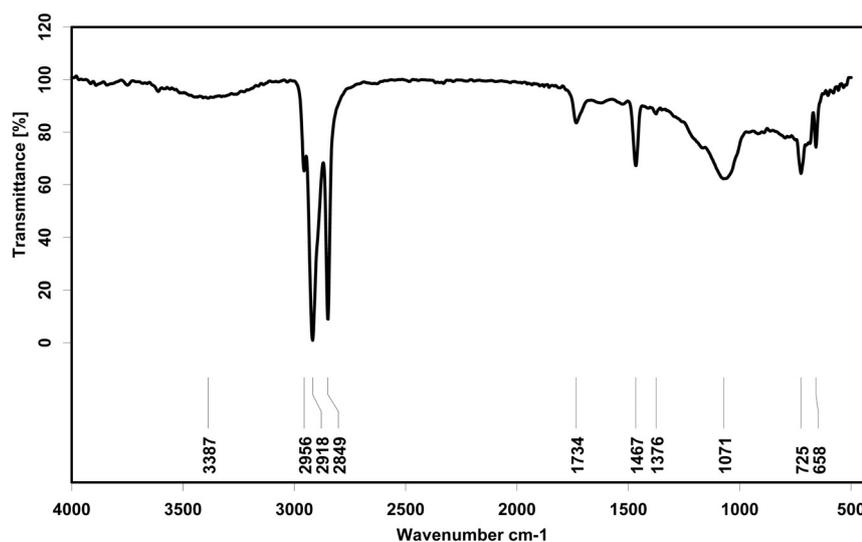


Abb. 18: FT-IR-Spektrum der *kryo-adhesiv* extrahierten, epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers auf dem ZnS-Substrat.

Die Anwesenheit von Alkoholen zeigte sich an der Streckschwingung der OH-Gruppe bei 3387 cm^{-1} .

Die für Fettsäuren typische Carbonylschwingung um 1710 cm^{-1} war als stark verbreiterte Bande hypsochrom verschoben (1734 cm^{-1}). Diese Beobachtung ließ auf eine relativ hohe Konzentration von Estern oder Aldehyden schließen. Beide Substanzklassen wurden in der GC-MS aber nur als Spuren detektiert.

Auch das Signal um 1071 cm^{-1} ließ sich mit den Ergebnissen der GC-MS nicht in Übereinstimmung bringen. In diesem Bereich lagen die Streckschwingungen der Kohlenstoff-Sauerstoff-Einfachbindung von Alkoholen ($1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), Carbonsäuren ($1440\text{-}1210\text{ cm}^{-1}$) und Estern ($1190\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$). Alle drei Substanzklassen stellten laut der GC-MS-Analytik aber nur Neben- bzw. Spurenkomponenten der Kirschlorbeerwaxse dar.

Die zu einer höheren Wellenzahl von 1150 cm^{-1} hin verschobene Schulter des Signals um 1071 cm^{-1} konnte ebenso wie die Carbonylschwingung bei 1734 cm^{-1} durch Ester erklärt werden. Die Intensitäten beider Schwingungen standen aber im Kontrast zu den Ergebnissen der GC-MS-Analyse, die als einzige Esterstrukturen Acetate als Spurenkomponenten identifizierte.

Langkettige Wachsester aus Fettsäuren und primären Fettalkoholen waren bislang nicht für den Kirschlorbeer beschrieben, wurden aber in den Extrakten der Blattoberfläche anderer Pflanzenspezies sowohl als Neben-, als auch als Hauptbestandteile identifiziert^[109, 150-156].

Solche Ester mit Kettenlängen im Bereich von 36 bis 72 Kohlenstoffatomen konnten aufgrund der Messbedingungen in der GC-MS-Analytik nicht erfasst werden. Die Untersuchung des Wachsextraktes mittels MALDI-TOF-MS sollte aber Hinweis auf die Präsenz höhermolekularer, für den Kirschlorbeer noch unbeschriebener Verbindungen geben.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der GC-MS-Analyse waren im MALDI-TOF-MS die zu erwartenden Signale für die ⁷Lithiumaddukte der Alkane, Alkohole, Fettsäuren, Aldehyde und Acetate ($\text{C}_{20}\text{-C}_{33}$) im Bereich von 300 bis 500 Da zu finden. Zusätzlich zu den Matrixaddukten der bekannten Wachskomponenten trat eine weitere Serie von Signalen im Massenbereich um 700 Da auf [Abb. 19].

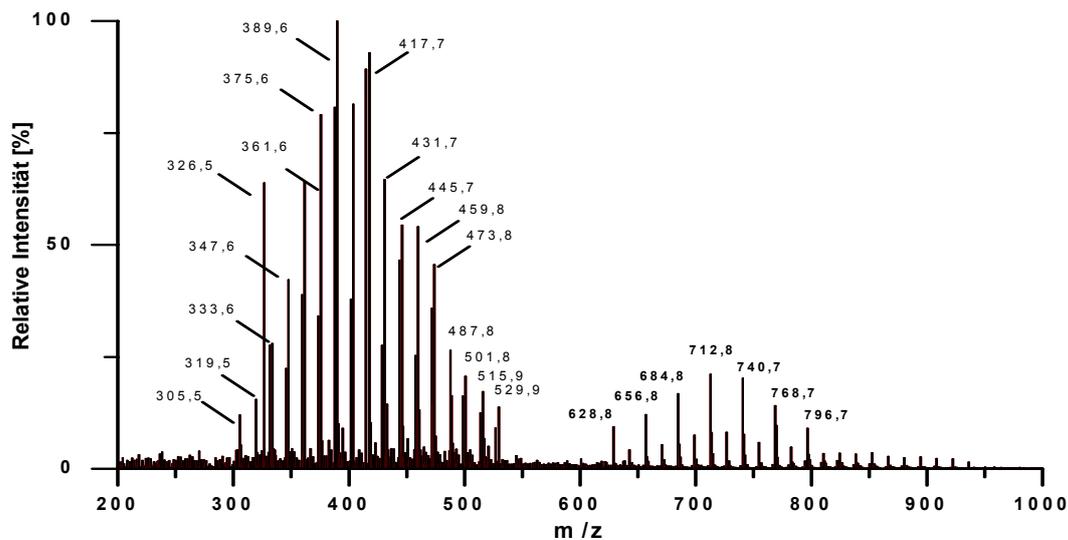


Abb. 19: MALDI-TOF-Massenspektrum der *kryo-adhesiv* extrahierten, epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers unter Einsatz der $^7\text{LiDHB}$ -Matrix.

Diese Massen ließen sich mit den bisherigen Kenntnissen zur Zusammensetzung der epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers nicht erklären, konnten aber mit Estern aus langkettigen Fettsäuren und primären Alkoholen begründet werden.

Alkylester mit Kettenlängen von C_{36} bis C_{72} sollten als ^7Li -Addukte Massen im Bereich von 544 Da ($\text{C}_{36}\text{H}_{72}\text{O}_2 + ^7\text{Li}$) bis 1049 Da ($\text{C}_{72}\text{H}_{144}\text{O}_2 + ^7\text{Li}$) zeigen.

Innerhalb des Signalclusters von 628 Da bis 922 Da unterschieden sich die einzelnen Ionen um 14 Da, was einem Kettenlängenunterschied von einer CH_2 -Einheit entsprach.

Da sowohl Fettsäuren als auch Fettalkohole aufgrund ihrer Biosynthese bevorzugt als geradzahlige Homologen auftraten, sollten sie auch Ester mit bevorzugt gerader Anzahl an Kohlenstoffatomen bilden. Dies erklärte die Massendifferenz von 28 Da (zwei CH_2 -Einheiten, eine Kettenverlängerung durch MalonylCoA in der Biosynthese) bei den Ionen mit erhöhter Intensität.

Tabelle 6 zeigt die beobachteten und theoretischen Adduktionen entsprechender Ester und mögliche Struktureinheiten aus Fettsäure (FS) und primärem Alkohol (OH).

C-Kette	$[M+^7Li]_{\text{theor.}}$	$[M+^7Li]_{\text{gef.}}$	mögliche Zusammensetzung aus Fettsäure (FS) und n-Alkohol (OH)
40	599,99	600,81	FS(16)+OH(24), FS(18)+OH(22), FS(20)+OH(20)...
42	628,04	628,82	FS(16)+OH(26), FS(18)+OH(24), FS(20)+OH(22)...
44	656,09	656,8	FS(16)+OH(28), FS(18)+OH(26), FS(20)+OH(24)...
46	684,15	684,79	FS(18)+OH(28), FS(20)+OH(26), FS(22)+OH(24)...
48	712,20	712,77	FS(20)+OH(28), FS(22)+OH(26), FS(24)+OH(24)...
50	740,25	740,74	FS(20)+OH(30), FS(22)+OH(28), FS(24)+OH(26)...
52	768,30	768,7	FS(22)+OH(30), FS(24)+OH(28), FS(26)+OH(26)...
54	796,35	796,65	FS(24)+OH(30), FS(26)+OH(28), FS(28)+OH(26)...
56	824,41	824,6	FS(24)+OH(32), FS(26)+OH(30), FS(28)+OH(28)...
58	852,46	852,54	FS(26)+OH(32), FS(28)+OH(30), FS(30)+OH(28)...
60	880,51	880,51	FS(26)+OH(34), FS(28)+OH(32), FS(30)+OH(30)...
62	908,56	908,46	FS(28)+OH(34), FS(30)+OH(32), FS(32)+OH(30)...

Tab. 6: Auflistung theoretischer und beobachteter Massen im MALDI-TOF-MS-Spektrum des Kirschchlorbeerextraktes und Zusammensetzung möglicher Ester.

3.2.4 Identifikation der unbekanntesten Verbindungen

Um die Struktur der vermuteten Ester aufzuklären, wurden die epikutikulären Wachse mit Metallhydriden reduziert. Die Reaktion mit Lithiumaluminiumhydrid ($LiAlH_4$) reduzierte alle Fettsäuren, Aldehyde und Ester zu den entsprechenden primären Alkoholen [Abb. 20A]. Durch die Behandlung des Wachsextraktes mit Lithiumaluminiumdeuterid ($LiAlD_4$) konnten nach der Reduktion anhand der unterschiedlichen Deuterierungsgrade der Produkte die strukturelle Herkunft und Zusammensetzung der ursprünglichen Verbindungen aufgeklärt werden. Alle freien wie auch in Estern gebundenen Fettsäuren traten nach der Reduktion mit $LiAlD_4$ als zweifach deuterierte primäre Alkohole auf, Aldehyde erschienen als einfach deuterierte Alkohole, freie Alkohole und die aus Estern freigesetzten zeigten keine Isotopenmarkierung [Abb. 20B].

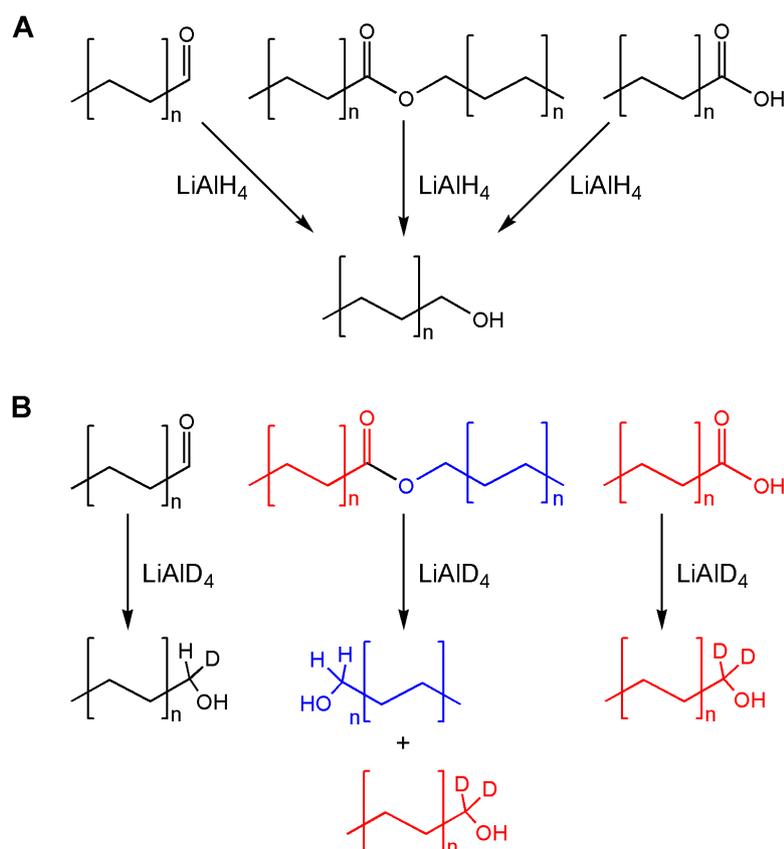


Abb. 20: Schematische Darstellung der Reduktionsprodukte mit A) LiAlH_4 , B) LiAlD_4 unter Kennzeichnung der verschiedenen Deuterierungsgrade der entstehenden Alkohole.

Die für die Derivatisierungsreaktionen eingesetzten Wachsproben wurden ebenfalls unter Verwendung der Metallplättchen *kryo-adhesiv* extrahiert. Jeweils 30 Plättchen wurden pro Extrakt verwendet, n-Eicosan als interner Standard eingesetzt und für jede Derivatisierung vier Wiederholungen angefertigt.

Die FT-IR-Spektren der Reduktionsansätze zeigten im Vergleich zum unbehandelten Wachs keine Carbonylbande um 1730 cm^{-1} .

Auch die starke Absorption der C-O-Streckschwingung bei 1150 cm^{-1} in den Kontrollproben war nach der Reduktion bathochrom verschoben.

Ebenso ließ sich auch eine starke Zunahme der OH-Schwingung um 3300 cm^{-1} vermerken und bei den Proben der LiAlD_4 -Reduktion waren die CD-Schwingungen um 2200 cm^{-1} zu beobachten [Abb. 21].

Diese Ergebnisse ließen auf eine vollständige Reduktion der Wachsextrakte schließen.

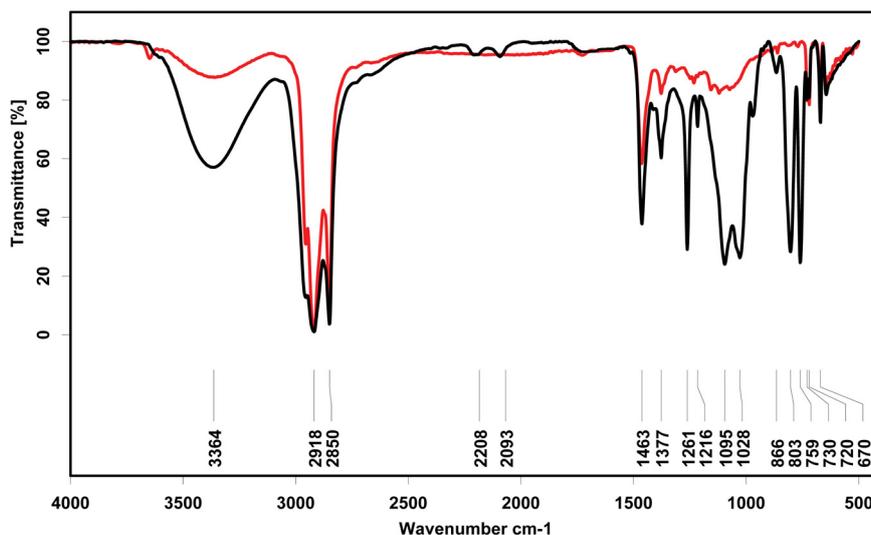


Abb. 21: FT-IR-Spektren der Reduktionsansätze mit LiAlH₄ (rot) und LiAlD₄ (schwarz).

Wie zu erwarten, wurden im MALDI-Massenspektrum nach den Reduktionen keine Signale mit Massen größer als 530 Da detektiert, was den Abbau der vermuteten Ester bestätigte.

Im Massenspektrum des unbehandelten Wachses waren die ⁷Lithiumaddukte der Alkohole C₂₆ (389 Da) und C₂₈ (417 Da), der Fettsäuren C₂₄ (375 Da), C₂₆ (403 Da), C₂₈ (431 Da) und der Alkane C₂₇ (387 Da), C₂₉ (415 Da) und C₃₁ (443 Da) die Signale mit den höchsten Intensitäten (siehe Kapitel 3.2.3).

Im Gegensatz dazu besaß im Spektrum des LiAlH₄-Reduktionsansatzes das Matrixaddukt des Alkohols C₂₄ (361 Da) die höchste Intensität. Darüber hinaus wurden intensive Signale bei 249 und 277 Da beobachtet, die den ⁷Lithiumaddukten der Alkohole C₁₆ und C₁₈ zugeordnet wurden.

Der LiAlD₄-Ansatz zeigte ebenfalls das Auftreten zweier neuer Signale bei 251 bzw. 279 Da, die als die zweifach deuterierten Alkohole C₁₆ und C₁₈ identifiziert wurden. Das Signal mit der höchsten Intensität entsprach dem d₂-Alkohol C₂₄ mit 363 Da.

Der Vergleich beider Reduktionsansätze zeigte, dass bei den Alkoholen bis C₂₄ der Anteil an zweifach deuterierten gegenüber den unmarkierten Alkoholen überwog, ab C₂₆ war der Anteil unmarkierter Alkohole größer [Abb.22].

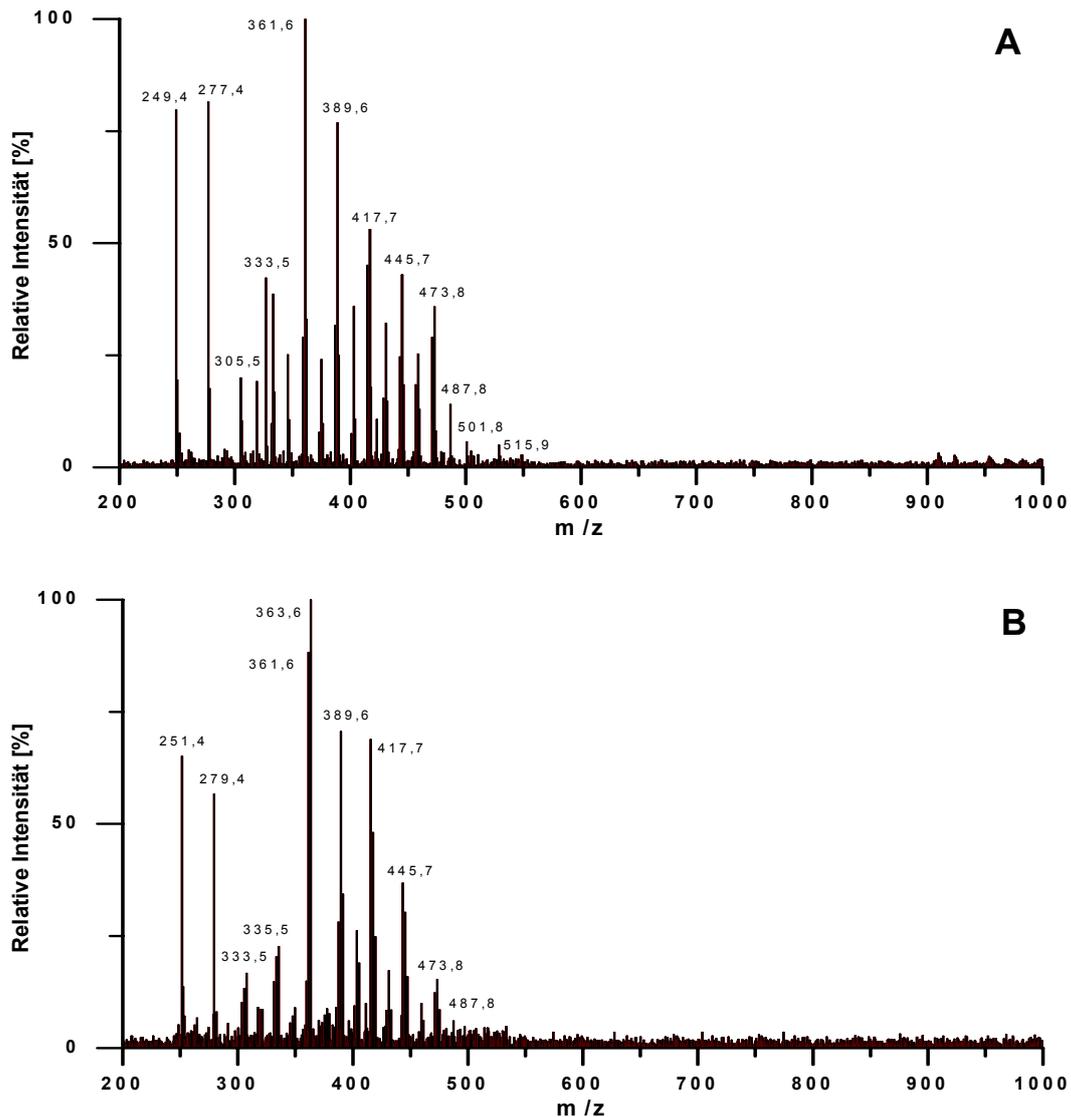


Abb. 22: MALDI-TOF-MS-Spektren der epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers nach Reduktion mit A) LiAlH_4 , B) mit LiAlD_4 .

Die qualitative und quantitative Analyse der Reduktionsansätze mittels GC-MS und GC-FID gab Aufschluß über die relative Zusammensetzung der Ester durch den Vergleich der Alkoholintensitäten zwischen reduzierten und unbehandelten Proben.

Eine Trennung deuterierter und nicht deuterierter Alkohole gleicher Kettenlänge im GC-MS war unter den beschriebenen Messbedingungen nicht möglich, aber anhand entsprechender Ionenspuren konnten Alkohole gleicher Kettenlänge und unterschiedlichem Deuteriumgehalt individuell ausgewertet werden. Dies erlaubte die quantitative Unterscheidung zwischen Alkoholen die aus Fettsäuren bzw. deren Anteil in Estern generiert wurden und denen, die frei bzw. als Alkoholkomponente in Estern gebunden waren.

Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung nach den Reduktionen mit LiAlH_4 (PL5-PL8) und LiAlD_4 (PL9-PL12) im Vergleich zum unbehandelten Wachs (PL1-PL4).

Kettenlänge	unbehandelt (PL1-PL4)			LiAlH_4 -Reduktion (PL5-PL8)		LiAlD_4 -Reduktion (PL9-PL12)	
	Alkane	Alkohole	FS	Alkane	Alkohole	Alkane	Alkohole
16	-	-	-	-	1,5	-	1,5
18	-	-	-	-	2,2	-	2,1
20	-	0,7	10,4	-	4,3	-	4,3
21	-	1,3	2,7	-	1,2	-	1,2
22	-	1,8	8,5	-	8,5	-	8,6
23	tr.	0,5	4,5	0,5	1,7	0,5	1,7
24	1,7	25,4	19,4	1,9	23,9	1,9	23,9
25	3,8	1,5	4,6	4,0	2,3	4,0	2,3
26	3,3	26,6	16,9	3,7	23,0	3,7	23,1
27	7,4	1,6	5,2	8,4	2,0	8,5	2,0
28	4,0	14,3	12,8	4,4	12,4	4,4	12,4
29	42,6	4,1	2,8	40,9	2,4	41,1	2,4
30	3,2	9,3	11,3	3,2	8,0	3,3	8,0
31	29,2	5,1	-	30,0	2,4	30,3	2,4
32	1,8	7,8	0,7	1,5	4,2	0,8	4,2
33	2,8	-	-	1,5	-	1,5	-
gesamt [%]	71,3	17,9	10,8	60,8	39,2	60,5	39,5

Tab. 7: Prozentuale Zusammensetzung der epikutikuralen Wachse des Kirschlorbeers im unbehandelten Wachs (PL1-PL4), nach Reduktion mit LiAlH_4 (PL5-PL8) und LiAlD_4 (PL9-PL12) sowie die relative Zusammensetzung der Gesamtgemische (in %). tr. bedeutet <0,5 %.

Wie man der prozentualen Zusammensetzung des Wachsgemisches entnehmen konnte, ist der Anteil freier primärer Alkohole von rund 18 % in der Kontrolle (unbehandelte Wachsproben, PL1-PL4) auf ca. 40 % nach den Reduktionen (PL5-PL12) gestiegen.

Durch die Reduktion der freien Fettsäuren, Aldehyde und Acetate allein ließ sich dieser Anstieg nicht erklären. In diesem Fall hätte der Anteil an primären Alkoholen bei rund 29 % liegen müssen. Ebenso konnte das Auftreten der Alkohole C_{16} und C_{18} , die im unbehandelten Gemisch weder als primärer Alkohol noch als Fettsäure vorlagen, nur durch die Spaltung von Estern erklärt werden.

Die Differenz zwischen den Peakflächen der freien Alkohole nach der Reduktion und der Summe der Peakflächen freier Alkohole und Fettsäuren im unbehandelten Wachs zeigte, dass der Anteil insbesondere geradzahliger Alkohole mit Kettenlängen von 16 bis 32 C-Atomen stieg, mit einer maximalen Zunahme bei C₂₄ und C₂₆.

Der Vergleich zwischen den Reaktionsprodukten der LiAlD₄-Reduktion und dem unbehandelten Wachs erlaubte die Unterscheidung zwischen den aus Estern generierten Alkoholen von den frei vorliegenden Fettsäuren und Alkoholen.

So stellte die Differenz aus den Peakflächen der d₂-Alkohole des LiAlD₄-Ansatzes und den Peakflächen der Fettsäuren gleicher Kettenlängen in den unbehandelten Proben die Fettsäurekomponenten der gespaltenen Ester dar. Die unbekanntesten Ester setzten sich also vorwiegend aus kürzerkettigen Fettsäuren mit 16 bis 26 C-Atomen zusammen.

Die gleiche Betrachtung der unmarkierten Alkohole der LiAlD₄-Reduktion und der Alkohole im unbehandelten Wachs zeigte, dass durch die Reduktion der Ester hauptsächlich Alkohole mit 24 bis 30 C-Atomen gebildet wurden, mit einem Maximum bei C₂₄.

Diese Kettenlängenverteilung korrelierte mit den Ergebnissen der MALDI-TOF-MS. Sowohl bei den zweifach als auch den undeuterten Alkoholen überwogen die Homologen mit geradzahliger Kohlenstoffkette (siehe Anhang). Die Kombination der Alkohole und Fettsäuren zu Estern unter Beachtung der über GC-TOF ermittelten quantitativen Verteilung ergab die in Abbildung 23 dargestellte theoretische Intensitätsverteilung der ⁷Li-Addukte.

Ester mit einer Gesamtzahl von 46, 48 und 50 Kohlenstoffatomen waren die häufigsten Verbindungen und bildeten in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der MALDI-TOF-MS die Ionen mit höchster Intensität.

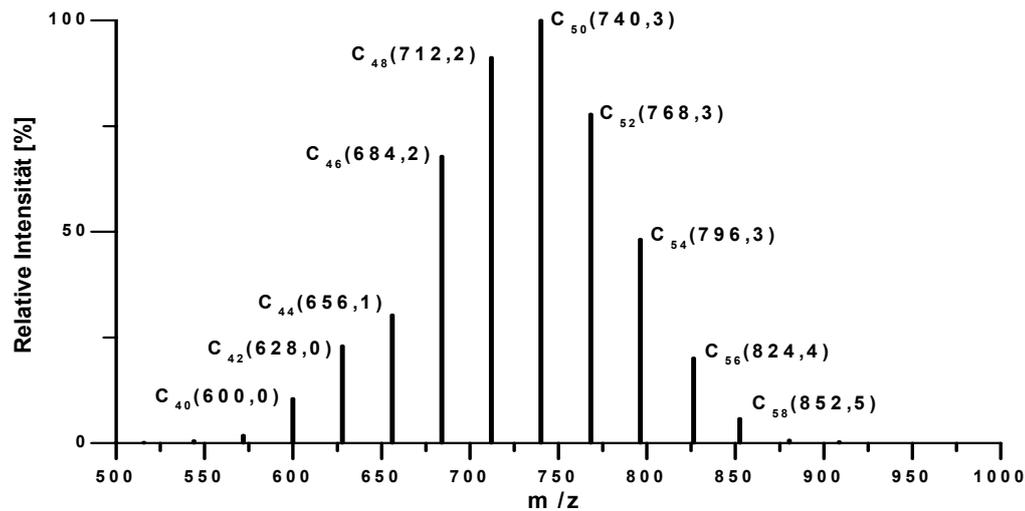


Abb. 23: Theoretische Molgewichtsverteilung der langkettigen Ester durch Kombination der Alkohole und Fettsäuren basierend auf der quantitativen Auswertung über GC-TOF.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse von GC-MS, MALDI-TOF-MS und FT-IR nach den Reduktionen, dass es sich bei den unbekanntem Strukturen im Kirschlorbeerwachs um Ester handelte. Diese setzten sich aus Fettsäuren mit den vorwiegenden Kettenlängen von C₁₆, C₁₈ und C₂₄ zusammen, während die Alkoholkomponente der Ester Kettenlängen von C₂₄ bis C₃₀ aufwies. Bei einer Wachsbeladung von 13,89 µg cm⁻² für die adaxialen Blattoberflächen des Kirschlorbeers ergaben sich unter Berücksichtigung der identifizierten Ester die in Tabelle 8 angegebene neue prozentuale Zusammensetzung des Wachsgemisches und die Oberflächenbedeckung der einzelnen Substanzklassen.

	Alkane	n-Alkohole	Fettsäuren	Ester	gesamt
gesamt [%]	65,8	16,6	9,8	7,8	100,0
Oberflächenbedeckung [µg cm⁻²]	3,69	3,53	3,45	3,22	13,89

Tab. 8: Prozentuale Zusammensetzung und Oberflächenbedeckung der einzelnen Substanzklassen im epikutikularen Kirschlorbeerwachs unter Berücksichtigung der Ester.

Alkane waren nach wie vor die Hauptsubstanzklasse, langkettige Ester stellten nun aber mit 3,22 µg cm⁻² rund ein Viertel der Oberflächenbedeckung der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers dar.

3.3 Kombinierte Imaging FT-IR- und MALDI-TOF-MS zur Analyse der Blattoberfläche des Kirschlorbeers

3.3.1 Analyse der Wachsverteilung auf der adaxialen Blattoberfläche

Nach der Analyse der Wachszusammensetzung des Kirschlorbeers und der Entwicklung der kombinierten Oberflächenanalytik aus Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS wurde die räumliche Anordnung der epikutikularen Wachse auf der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers analysiert. Dabei wurde untersucht, ob auf der voll entwickelten Blattoberfläche eine durchgehend homogene Verteilung der Wachssubstanzen vorlag oder ob sich in Abhängigkeit des unter der Wachsschicht befindlichen Blattgewebes Unterschiede in der Bedeckung beobachten ließen. Dafür wurde die adaxiale Blattoberfläche mit Haupt- bzw. Nebenadern (Leitbündel) über die beschriebene Methode der *kryo-adhesiven* Extraktion als Negativabdruck auf den ZnS-Träger übertragen.

Abbildung 24 zeigt die untersuchte Blattoberfläche, den entsprechenden Wachsabdruck auf dem ZnS-Substrat sowie eine REM-Aufnahme der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers mit einer Hauptblattader.

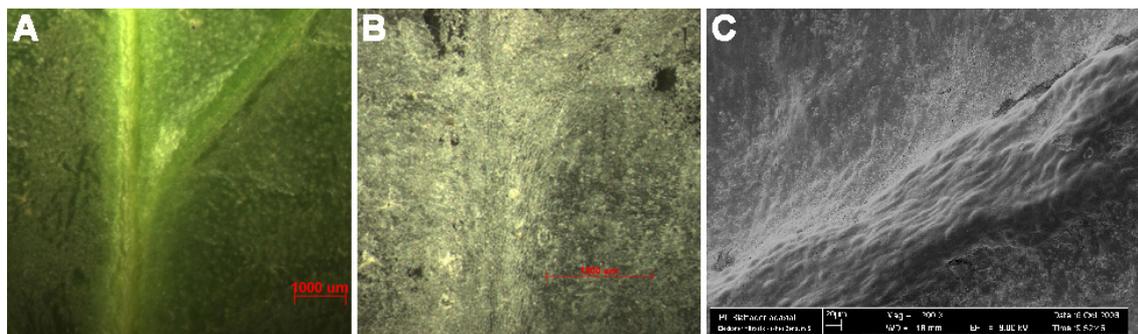


Abb. 24: Mikroskopische Aufnahmen des Kirschlorbeers: A) adaxiale Blattoberfläche mit Haupt- und Nebenader, B) *kryo*-Wachsabdruck auf dem ZnS, C) REM-Aufnahme der adaxialen Blattoberfläche mit Hauptader.

Über die Imaging FT-IR wurden von der Blattoberseite über einen Ausschnitt von 3,0 x 3,0 mm Größe im Abstand von je 75 µm Transmissionspektren aufgenommen.

Die Intensität einer Absorption, der eine bestimmte funktionelle Molekülgruppe zugrunde lag, wurde zur Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Substanzklassen auf der betrachteten Probenfläche verwendet. Als Intensität einer Absorption wurde die Fläche unter der entsprechenden Absorptionsbande betrachtet, die über die Integrationsmethode B der OPUS 5.5 Software ermittelt wurde. Die Fläche einer bestimmten Absorptionsbande wurde von der Software als Vielfaches einer im Programm definierten Teilfläche dargestellt. Daher zeigen die Skalierungen der Oberflächenimages auch die dimensionslosen Vielfachen dieser Teilfläche und sind nicht direkt mit einer Maßeinheit korreliert. Für die quantitative Untersuchung der CH₃/CH₂-Absorptionen tragen die entsprechenden Skalen die Einheit der Oberflächenbedeckung: $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Da sich die epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers hauptsächlich aus Alkanen, Alkylestern, n-Alkoholen und Fettsäuren zusammensetzten, wurden zur Untersuchung der Wachsverteilung die in Tabelle 9 angegebenen charakteristischen Banden bzw. Wellenzahlenbereiche ausgewertet.

	Integrationsbereich [cm^{-1}]				
	3500-3099	2829-2975	1695-1749	1440-1486	1000-1200
Alkane	-	$\nu_{\text{s/as}}$ CH ₃ /CH ₂	-	δ CH ₃ /CH ₂	
Ester	-	$\nu_{\text{s/as}}$ CH ₃ /CH ₂	ν C=O	δ CH ₃ /CH ₂	ν C-OC
n-Alkohole	ν OH	$\nu_{\text{s/as}}$ CH ₃ /CH ₂	-	δ CH ₃ /CH ₂	ν C-OH
Fettsäuren	-	$\nu_{\text{s/as}}$ CH ₃ /CH ₂	ν C=O	δ CH ₃ /CH ₂	ν C-OH

Tab. 9: Auflistung der Integrationsbereiche der Imaging FT-IR-Spektroskopie zur Auswertung der Wachsverteilung auf der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers.

Alkohole ließen sich anhand der charakteristischen Streckschwingung der Hydroxylgruppe in dem Wellenzahlenbereich von 3099-3500 cm^{-1} isoliert betrachten.

Die Verteilung des gesamten Wachsgemisches konnte durch Integration der CH₃/CH₂-Streckschwingungen (2829-2975 cm^{-1}) dargestellt werden, da diese in allen Wachssubstanzen die stärksten Absorptionen besaßen.

Die Integration des Bereiches der entsprechenden Deformationsschwingungen von 1440-1486 cm^{-1} führte zu Oberflächenbildern mit gleichartiger Verteilung, die sich nur hinsichtlich der Signalintensität unterschieden.

Aus diesem Grund sind die aus der Betrachtung der CH_3/CH_2 -Deformationsschwingung resultierenden Oberflächenbilder der Übersichtlichkeit halber nicht extra dargestellt.

Fettsäuren und Ester wurden in ihrer Verteilung durch Integration des Wellenzahlenbereiches der Carbonylstreckschwingung von $1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$ parallel beschrieben. Durch die Überlagerung der Streckschwingung der C-O-Einfachbindungen in Estern, Fettsäuren und Alkoholen konnten diese drei Substanzklassen anhand dieser Schwingung nicht unabhängig voneinander ausgewertet werden. Durch Integration des Wellenzahlenbereiches von $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ konnte aber die Verteilung dieser oxidierten Verbindungen im Gegensatz zu den Alkanen dargestellt werden.

Die quantitative Auswertung der Wachsverteilung auf der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers anhand der CH_3/CH_2 -Absorptionen und unter Verwendung der in Kapitel 3.1.3 durchgeführten Kalibration ist in Abbildung 25 dargestellt.

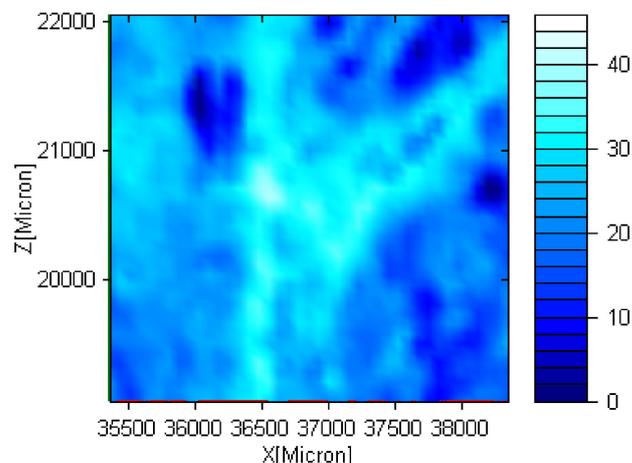


Abb. 25: Quantifizierung der Oberflächenwache des Kirschlorbeers anhand der CH_3/CH_2 -Streckschwingungen ($2829\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$). Die Einheit der Skalierung ist $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Wie Abbildung 25 zu entnehmen ist, lag die Oberflächenbedeckung der Wache auf der Blattader zwischen 30 und $40\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ und betrug somit rund das Doppelte der Intercostalbedeckung (Lamina ohne Blattadern) mit 10 und $25\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$. Die in Kapitel 3.2.2 über *kryo*-Extraktion bestimmte Oberflächenbedeckung der Lamina betrug rund $14\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$.

Eine Ursache für den höheren, über FT-IR ermittelten Bedeckungsgrad der Oberflächenabdrücke gegenüber dem via Extraktion bestimmten, könnte der „Verlust“ an Wachs während des Extraktionsverfahrens sein.

Unlösliche anorganische Rückstände auf der Blattoberfläche (z.B. Carbonate aus Regenwasser, gelöstes CO_2), die bei den Oberflächenabdrücken in der Probe erhalten blieben, könnten ebenfalls die beobachtete erhöhte Intensität begründen. Carbonate zeigen auch Absorptionen im Bereich von $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (Spektrum von Na_2CO_3 siehe Anhang) und könnten durch Überlagerung die Intensität der CH_3/CH_2 -Absorptionen erhöhen. Dies würde in einer scheinbar höheren Oberflächenbedeckung resultieren.

Die für das gesamte Wachsgemisch beobachtete Anreicherung der Substanzen auf der Blattader gegenüber dem Intercostalgewebe ließ sich auch für die einzelnen Substanzklassen beobachten. Abbildung 26 zeigt die Oberflächenverteilungen der in Tabelle 9 benannten Absorptionsbereiche [A-D].

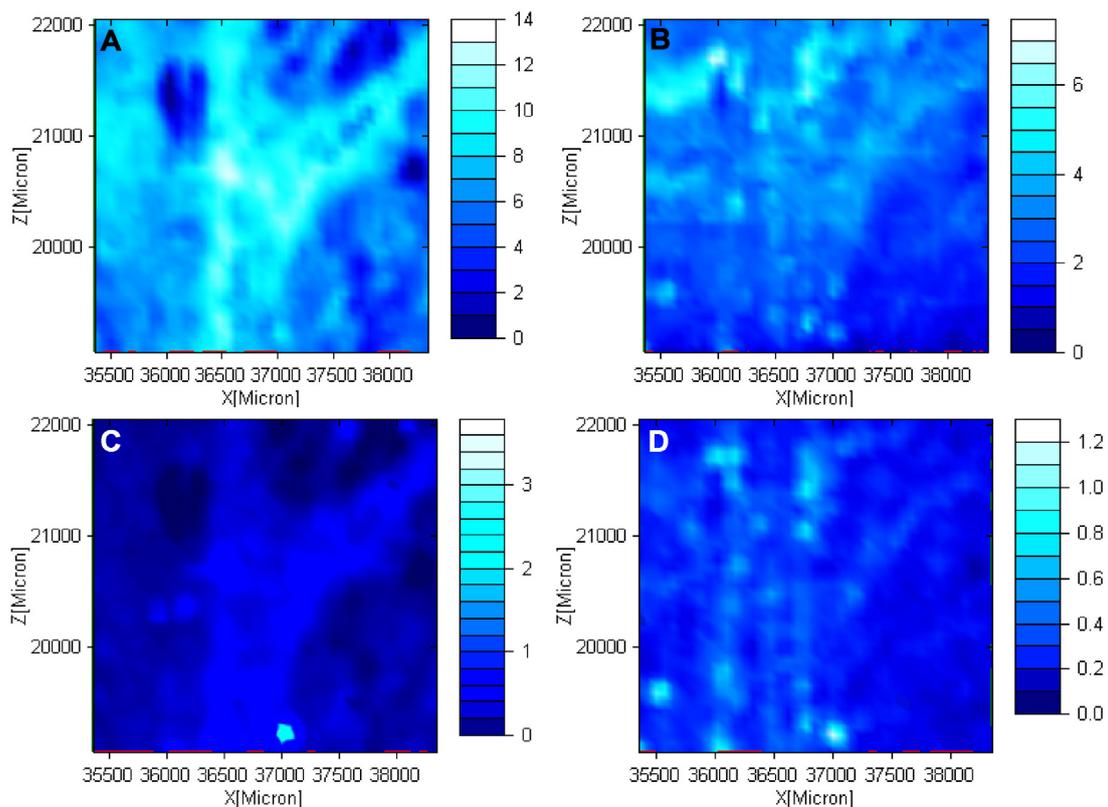


Abb. 26: Oberflächenbilder für die Integration der Wellenzahlenbereiche A) $2829\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$, B) $3099\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, C) $1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$ und D) $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Die Skalierungseinheiten sind dimensionslose Integrationswerte.

Wie den FT-IR-Images zu entnehmen war, lag eine Anreicherung aller Wachsstrukturen auf den Blattadern gegenüber dem Intercostalgewebe vor, wie die Intensitätsverteilung der CH_3/CH_2 -Streckschwingungen ($2829\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$, Abb. 26A) zeigte. Eine gleichartige Verteilung ließ sich ebenso für die Hydroxylgruppen ($3099\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, Abb. 26B) und die Carbonylgruppen ($1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$, Abb. 26C) beobachten, wobei beide Absorptionen aufgrund schwächerer Intensitäten zu weniger kontrastreichen Oberflächenbildern führten (schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis). Die Integration des Wellenzahlenbereiches der C-O-Streckschwingung ($1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, Abb. 26D), also die Summe der enthaltenen Fettsäuren, Alkohole und Ester, bestätigte ebenfalls eine Akkumulation der Wachse auf dem Adergewebe.

Auf dem Intercostalgewebe lag für alle Substanzklassen ebenfalls eine homogene Verteilung aber geringerer Konzentration vor. Punktuelle Bereiche mit höherer Intensität schienen in der zufälligen Anhäufung von Wachskristalloiden, wie sie auch in den REM-Aufnahmen zu beobachten waren, begründet zu sein.

Da sich über die Imaging FT-IR keine Einzelverbindungen, sondern nur die verschiedenen Substanzklassen darstellen ließen, wurde zur besseren Vergleichbarkeit bei der anschließenden Imaging MALDI-TOF-MS-Analyse die Verteilung der jeweils vier intensivitätsstärksten Homologen jeder Substanzklasse im Massenspektrum ausgewertet.

Durch Addition der zugehörigen Intensitäten für jeden gemessenen Probenpunkt konnte die gemeinsame Verteilung dieser vier Verbindungen abgebildet werden. Die Skalierung der Oberflächenimages basierte auf den relativen Intensitäten der betrachteten Ionen und wurde zur Vergleichbarkeit der Darstellungen auf den einheitlichen Bereich von 5 bis 255 Einheiten normiert. Diese Einteilung ergab sich aus der Farbcodierung (RGB-Farbraum, 8-Bit-Images). Der Wert 5 stellte dabei die geringste Intensität und somit das „Hintergrundrauschen“ der Messungen dar. Für ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 bedeutete dies, dass alle Intensitäten mit einem Skalenwert >15 als Signal zu betrachten waren.

In Übereinstimmung mit den FT-IR-Images wurde eine gleichartige Farbcodierung für die Imaging MALDI-TOF-MS gewählt, wobei helle Farben Bereiche mit hoher Intensität, dunkle Farben Bereiche niedriger Intensität darstellten.

Abbildung 27 zeigt die summierten Oberflächenimages für die 7 Lithiumaddukte der vier Hauptvertreter der Alkane (C_{27} , C_{29} , C_{31} , C_{33}) und Alkylester (C_{46} , C_{48} , C_{50} , C_{52}), sowie der primären Alkohole (C_{26} , C_{28} , C_{30} , C_{32}) und Fettsäuren (C_{24} , C_{26} , C_{28} , C_{30}).

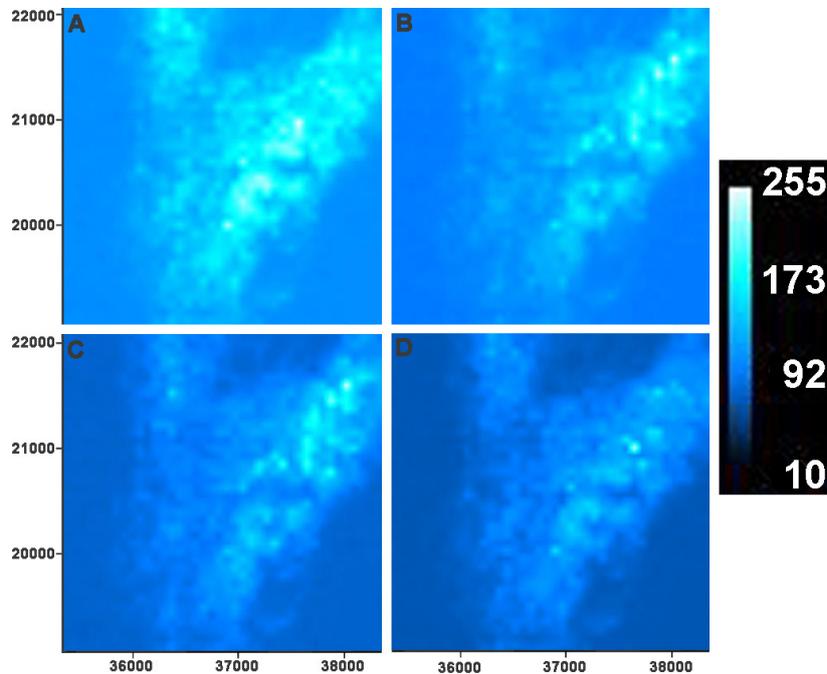


Abb. 27: MALDI-TOF-MS-Images A) Alkane (C_{27} , C_{29} , C_{31} , C_{33}), B) Alkylester (C_{46} , C_{48} , C_{50} , C_{52}), C) Alkohole (C_{26} , C_{28} , C_{30} , C_{32}) und D) Fettsäuren (C_{24} , C_{26} , C_{28} , C_{30}) auf der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers.

Auch die Imaging MALDI-TOF-MS bestätigte die Verteilungsunterschiede auf dem Blattgewebe und zeigte zwar eine homogene Verteilung der Wachsstrukturen auf dem Intercostalgewebe, allerdings in wesentlich geringerer Konzentration als auf dem Adergewebe.

Alle betrachteten Substanzklassen der epikutikularen Wachse akkumulierten auf bzw. um das Blattadergewebe herum mit bis zu dreifach höherer Konzentration gegenüber der Blattspreite, wie den jeweiligen Farbskalen zu entnehmen ist.

Die Alkane und Alkylester traten gegenüber den Alkoholen und Fettsäuren in höherer Konzentration auf, was sich ebenfalls an der Intensität ihrer Signale in den Oberflächenbildern darstellte.

Unabhängig also von der chemischen Funktionalität der einzelnen Wachse zeigte sich, dass die prozentuale Wachszusammensetzung über die Blattoberfläche konstant war.

Unterschiede in der Wachsbeladung ließen sich nur für das gesamte Wachsgemisch beobachten und zeigten eine Anreicherung der Lipide auf den Blattadern bzw. Leitbündeln.

Als pflanzenphysiologische Erklärung für diesen Konzentrationsunterschied wäre die spezielle Funktion der Leitbündel als Transportnetz innerhalb des pflanzlichen Organismus zu betrachten. In erster Linie dienen die Blattadern der Wasserversorgung des Pflanzengewebes sowie der Verteilung und des Abtransportes energiereicher Verbindungen aus den Blättern in die Speicherorgane. Solche Verbindungen sind beispielsweise photosynthetisch gebildete Kohlenhydrate und stickstoffreiche Strukturen (z.B. Aminosäuren). Eine verstärkte Wachsschicht auf den Leitbündeln der Blätter kann sowohl den diffusionsbedingten Wasserverlust vermindern, als auch den Befall durch Pathogene erschweren, für die ein Eindringen über die Blattadern der direkte Zugang zu den Nährstoffen der Pflanze darstellt.

3.3.2 Dynamische Entwicklung und Oberflächenverteilung der Ester

Neben Unterschieden in der Zusammensetzung der epikutikularen Wachse verschiedener Pflanzenarten und -spezies unterliegt die Chemie der Blattoberflächen auch einer durch die pflanzliche Entwicklung bedingten Dynamik.

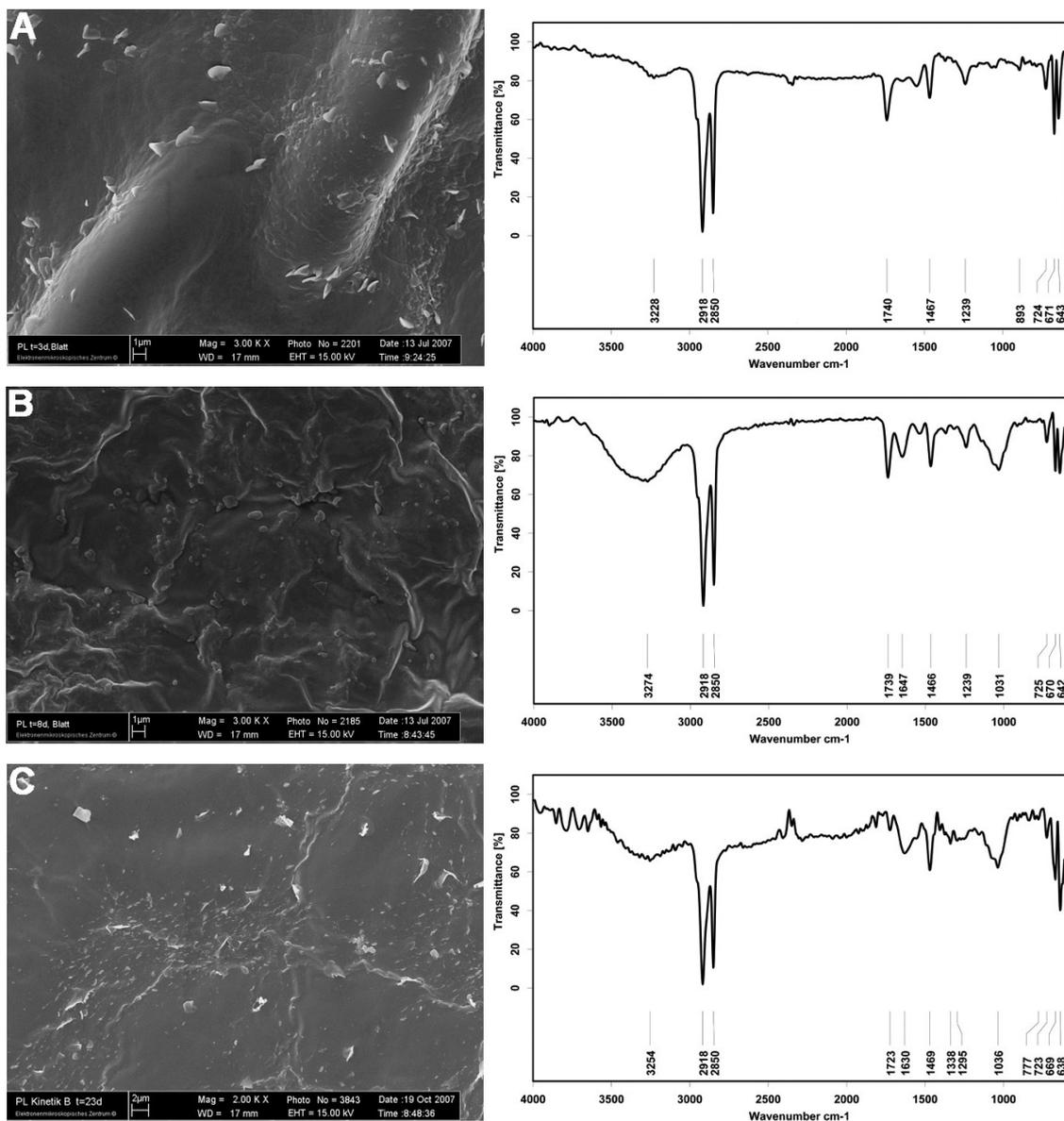
So wurde für den Kirschlorbeer die Zusammensetzung der epikutikularen Wachse in Abhängigkeit der Blattalterung untersucht^[19]. Alkoholacetate, die nach dem Knospensprung als Hauptkomponente der epikutikularen Wachse auftraten, wurden im Wachssystem des voll entwickelten Blattes nur noch in Spuren gefunden. Aldehyde erschienen erst ab dem 15. Tag nach Knospensprung und mit fortlaufender Blattalterung beobachtete man für alle Substanzklassen innerhalb der homologen Reihe eine Intensitätsverschiebung zu längeren Kohlenstoffketten.

Unter Verwendung der hier entwickelten Oberflächenanalytik wurden das Auftreten der Alkylester und die strukturelle Verteilung auf dem Blattgewebe in Abhängigkeit des Blattalters untersucht. Dafür wurden adaxiale Blattoberflächen zu den Zeitpunkten von 3, 8, 23, 43, 57, 70 und 100 Tagen nach Knospensprung untersucht.

Diese Zeiträume wiesen die größten dynamischen Veränderungen in der Wachszusammensetzung nach Jetter *et al.*^[19] auf.

Von den *kryo-adhesiven* Abdrücken der Blattoberflächen in den benannten Altersstadien wurden zunächst die FT-IR- und MALDI-TOF-MS-Spektren auf die Anwesenheit der langkettigen Alkylester überprüft und anschließend ein 1,5 x 1,5 mm großer Ausschnitt der Blattlamina über Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS auf charakteristische Verteilungsmuster der Ester untersucht.

Abbildung 28 zeigt die REM-Aufnahmen der unbehandelten Blattoberflächen und die entsprechenden FT-IR-Spektren der epikutularen Wachse jeweils zu den benannten Zeitpunkten.



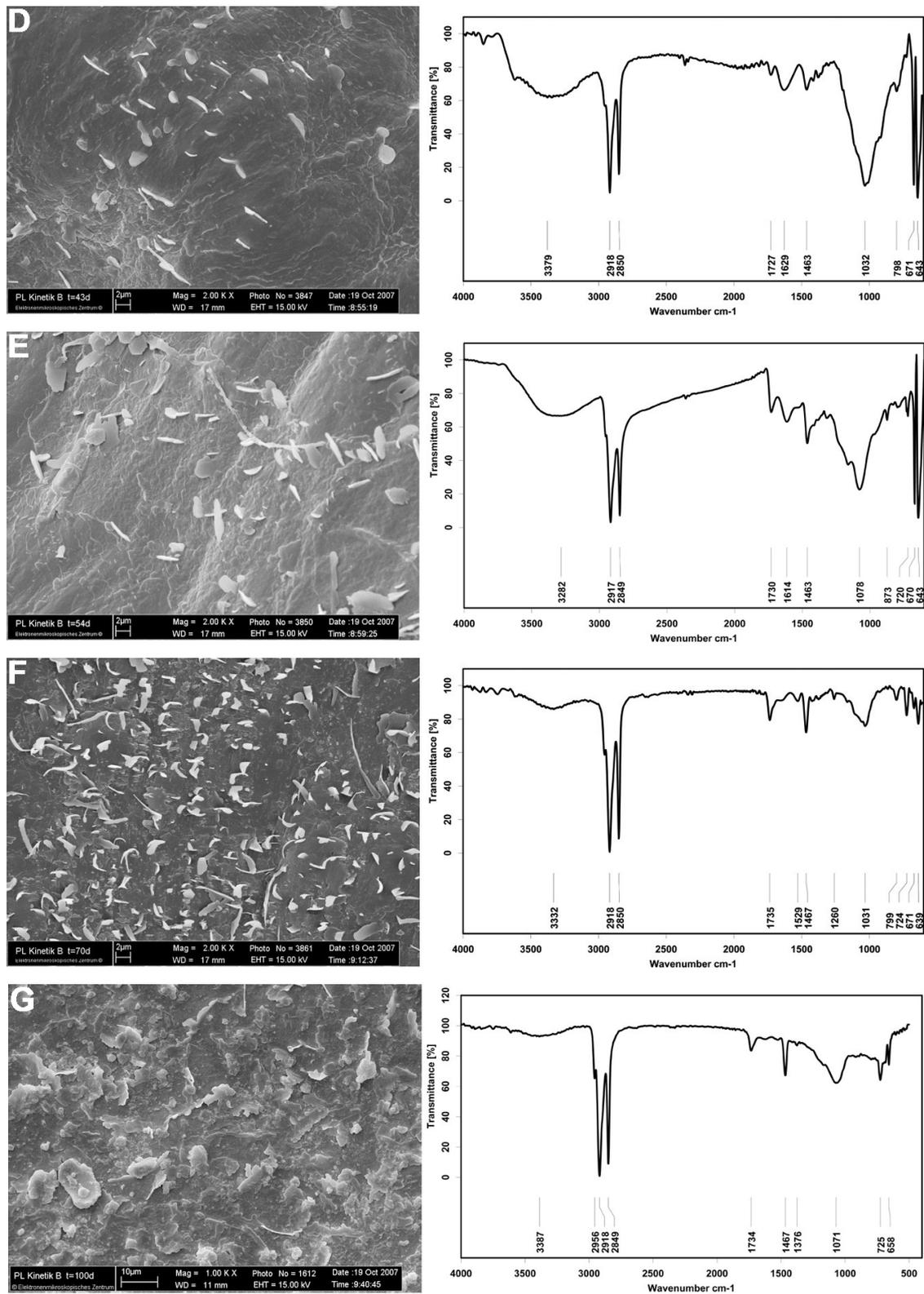


Abb. 28: REM-Aufnahmen der adaxialen Blattoberflächen des Kirschlorbeers und Transmissions-FT-IR-Spektren der entsprechenden Oberflächenabdrücke A) 3 d, B) 8 d, C) 23 d, D) 43 d, E) 54 d, F) 70 d und G) 100 d nach Knospensprung.

Wie aus den REM-Bildern der Blattoberflächen ersichtlich wurde, stieg die Bedeckung der epikutikularen Wachse mit fortschreitendem Alter des Blattes an.

Neben einer die Cutinmatrix bedeckenden Schicht bildeten sich bis zur Vollentwicklung des Blattes isolierte Kristalloidkompartimente aus. Diese nahmen in Anzahl und Größe während der Entwicklung des Blattes zu.

Gemäß der von Barthlott eingeführten Klassifikation und Terminologie der verschiedenen Wachsmorphologien konnten die Kristalloidstrukturen des Kirschlorbeers im Stadium des vollentwickelten Blattes ($t=100$ d) den sogenannten „non entire platelets“ zugeordnet werden^[34].

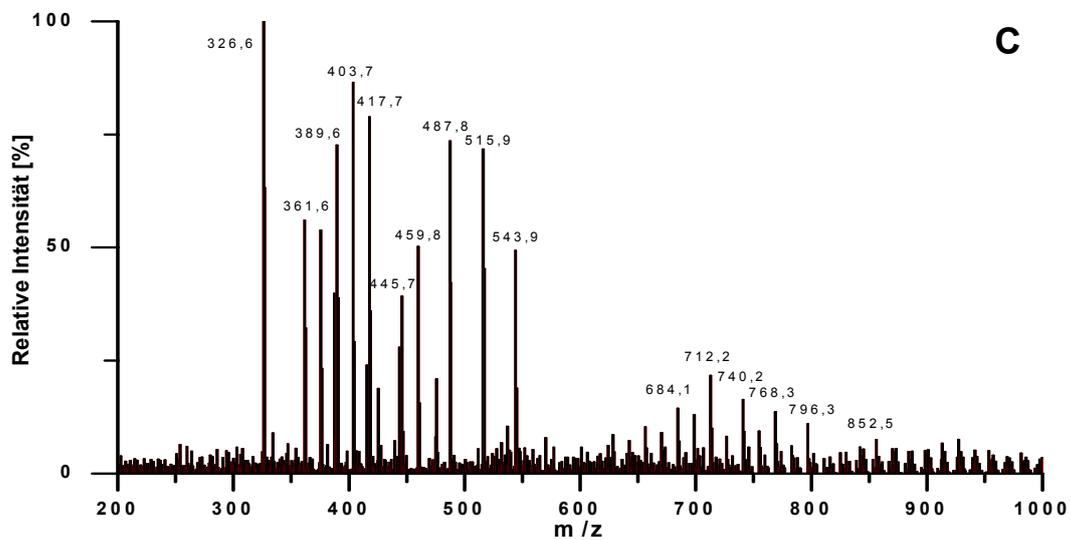
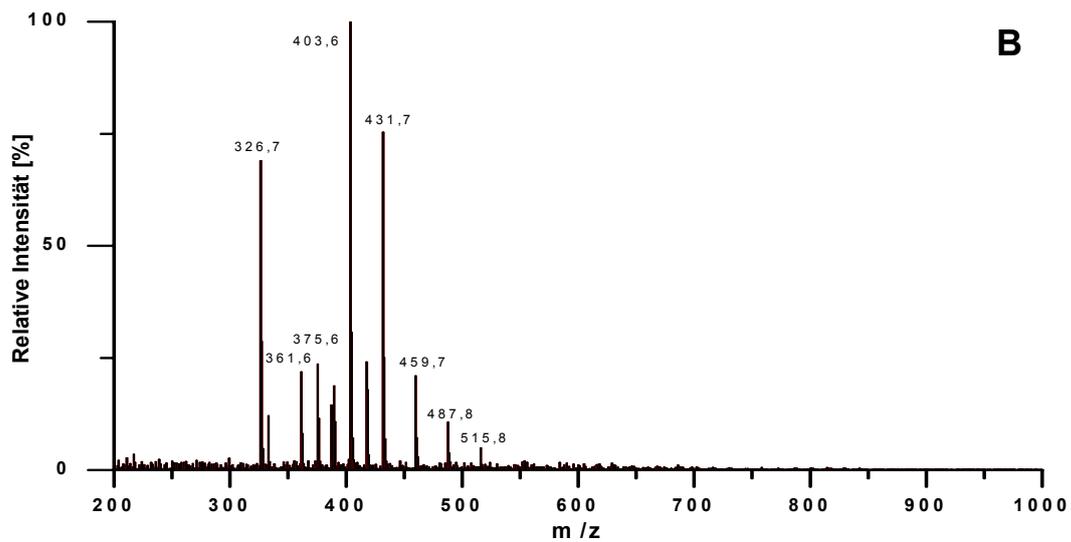
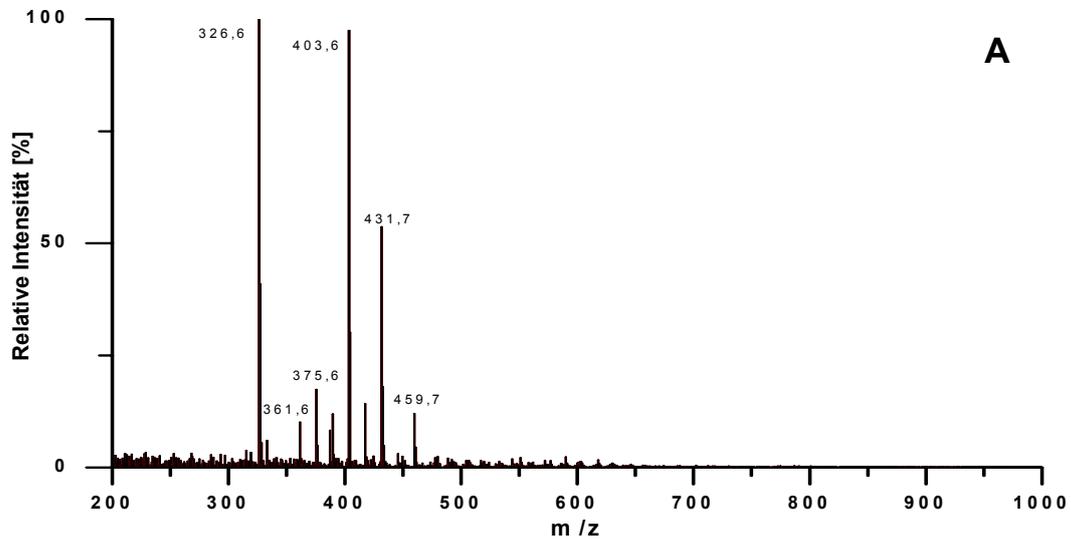
Diese Kristalloidstruktur als häufigste Erscheinungsform in allen Hauptpflanzengruppen (Moose, Farne, Gymnospermen, Angiospermen) ist an keine bestimmte Substanzklasse gebunden, besonders oft auf Blattadern zu finden und zeigt keine übergeordnete Orientierung auf der Blattoberfläche.

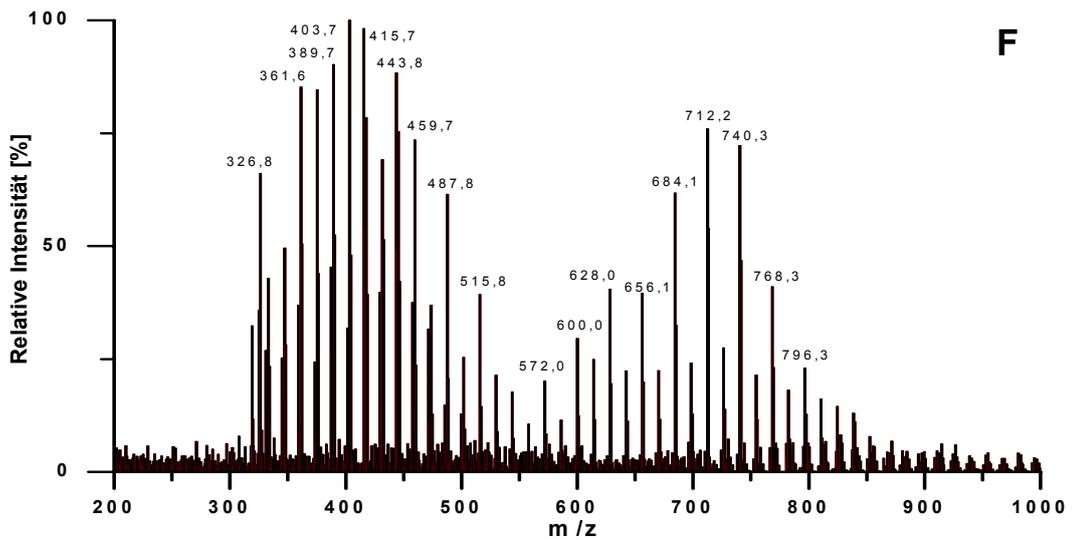
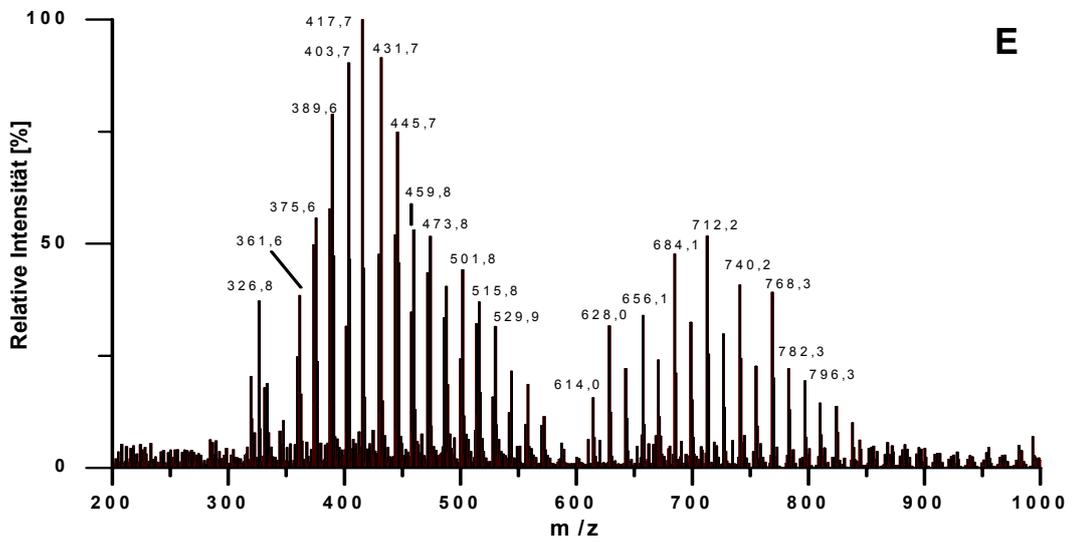
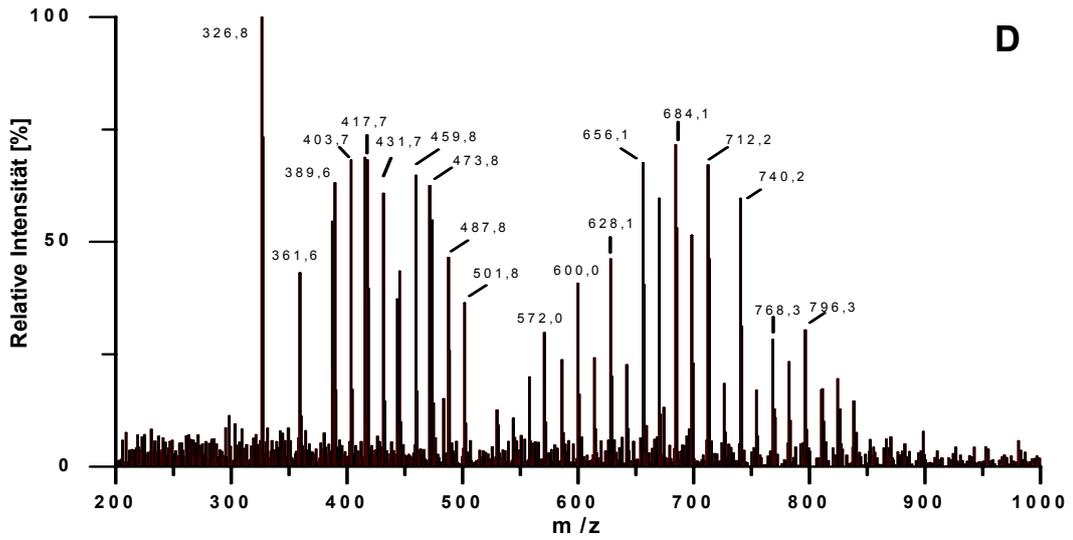
Der Vergleich der Transmissions-FT-IR-Spektren für die verschiedenen Altersstadien zeigte anhand der Absorptionsbanden der Carbonylschwingung die Veränderung der Zusammensetzung der epikutikularen Wachse. Während drei Tage nach Knospensprung das Wachs von Alkoholacetaten dominiert war (ν C=O 1740 cm^{-1}), nahm deren Anteil bei gleichzeitig steigendem Fettsäuregehalt bis zum 23. Tag ab, was sich in der bathochromen Verschiebung der Carbonylstreckschwingung (ν C=O 1723 cm^{-1}) darstellte. Parallel dazu stieg der Anteil an primären Alkoholen, was in der zunehmenden Intensität der OH-Schwingung um 3300 cm^{-1} zu beobachten war.

In der weiteren Blattentwicklung stieg der prozentuale Anteil an Alkanen bei gleichzeitiger Abnahme der Alkohole, Acetate und Fettsäuren, wie die zunehmende Intensität der CH_3/CH_2 -Streckschwingungen um $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ im Vergleich zu allen anderen Absorptionen zeigte.

Ab dem 43. Entwicklungstag beobachtete man eine hypsochrome Verschiebung der Carbonylschwingung, die in dem „Erscheinen“ der Alkylester auf der Blattoberfläche begründet war (ν C=O 1727 cm^{-1} für $t=43$ d, ν C=O 1734 cm^{-1} für $t=100$ d). Acetate oder Aldehyde, die diese Verschiebung ebenfalls verursachen konnten, traten ab diesem Zeitpunkt nur noch als Spuren im Wachsgemisch in Erscheinung und konnten daher nicht die entsprechende Intensität der Carbonylgruppe erklären.

Die MALDI-TOF-MS-Spektren zeigten das zeitliche Auftreten der langkettigen Ester um 700 Da [Abb. 29A-G].





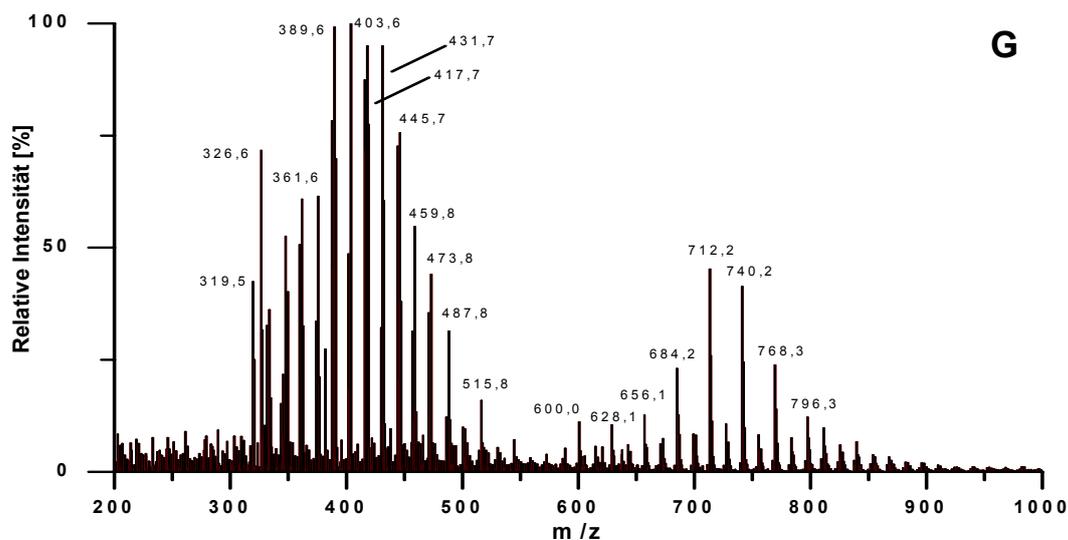


Abb. 29: MALDI-TOF-MS der Kirschlorbeerwache A) 3 d, B) 8 d, C) 23 d, D) 43 d, E) 54 d, F) 70 d und G) 100 d nach Knospensprung.

Der Vergleich der Spektren zeigte ein erstmaliges Auftreten der langkettigen Ester um 700 Da ab dem 23. Tag [Abb. 29C], mit einem Intensitätsmaximum um den 43. Tag nach Knospensprung [Abb. 29D]. Nach diesem Zeitpunkt überwogen wieder die kürzerkettigen Verbindungen im MS-Spektrum.

Zusätzlich bildete sich bei den Estern mit fortschreitender Blattalterung eine Dominanz der geradzahligen Alkylketten aus, was sich in der um 28 Da differierenden Signalserie zeigte [Abb. 29E].

Die Alkylester im Epikutikularwachs voll entwickelter Blätter reicherten sich also ähnlich wie die Alkane in einem späteren Entwicklungsstadium auf der Blattoberfläche an. Dies könnte in dem höheren biosynthetischen Aufwand ihrer Bildung gegenüber Fettsäuren und Alkoholen begründet sein.

Die quantitative Auswertung der Esterverteilung über Imaging FT-IR-Spektroskopie anhand der CH_3/CH_2 -Streckschwingung zeigte ab dem 23. Tag nach Knospensprung mit fortschreitender Blattalterung einen Anstieg der Wachsbedeckung [Abb. 30].

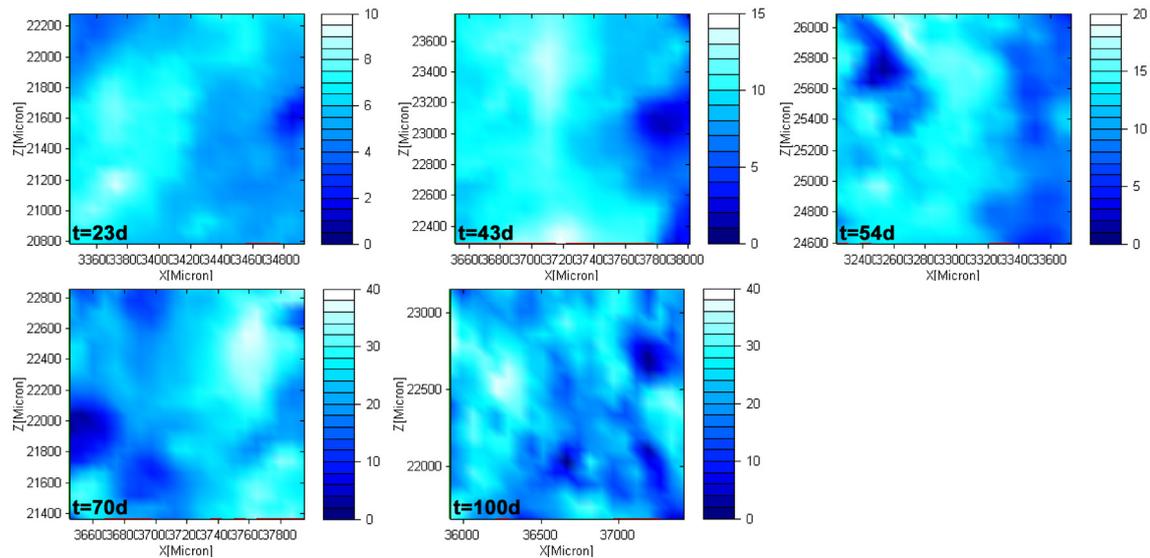
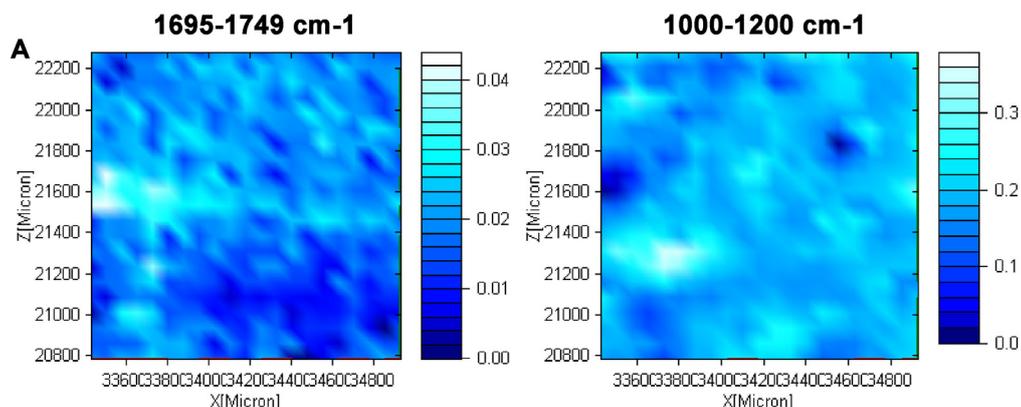


Abb. 30: Quantifizierung der Kirschlorbeerwache ab 23 d bis 100 d nach Knospensprung anhand der CH_3/CH_2 -Streckschwingung ($2829\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$). Die Skalierungseinheit ist $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Auch hier lag die durchschnittliche Oberflächenbedeckung über dem extraktiv bestimmten Wert. Der von Jetter *et al.*^[19] im Laufe der Blattalterung beobachtete Anstieg der Wachsbedeckung bei konstanter Blattoberfläche und epidermaler Zelldichte ließ sich aber auch hier beobachten. So stieg die Bedeckung ab $t=23\text{ d}$ von ca. $3\text{-}8\ \mu\text{g cm}^{-2}$ bis zur Vollentwicklung bei $t=100\text{ d}$ auf ca. $15\text{-}30\ \mu\text{g cm}^{-2}$ an.

Die Oberflächenimages der Carbonylabsorption ($1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$) und der C-O-Streckschwingungen ($1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) zeigten ebenfalls eine homogene Verteilung der Wache. Bereiche mit niedriger Intensität waren durch eine geringere Oberflächenbedeckung, nicht aber durch das Fehlen einer bestimmten Substanzklasse charakterisiert. Abbildung 31 zeigt die Intensitätsverteilung der Carbonylschwingung und der C-O-Einfachbindungen für den betrachteten Zeitraum.



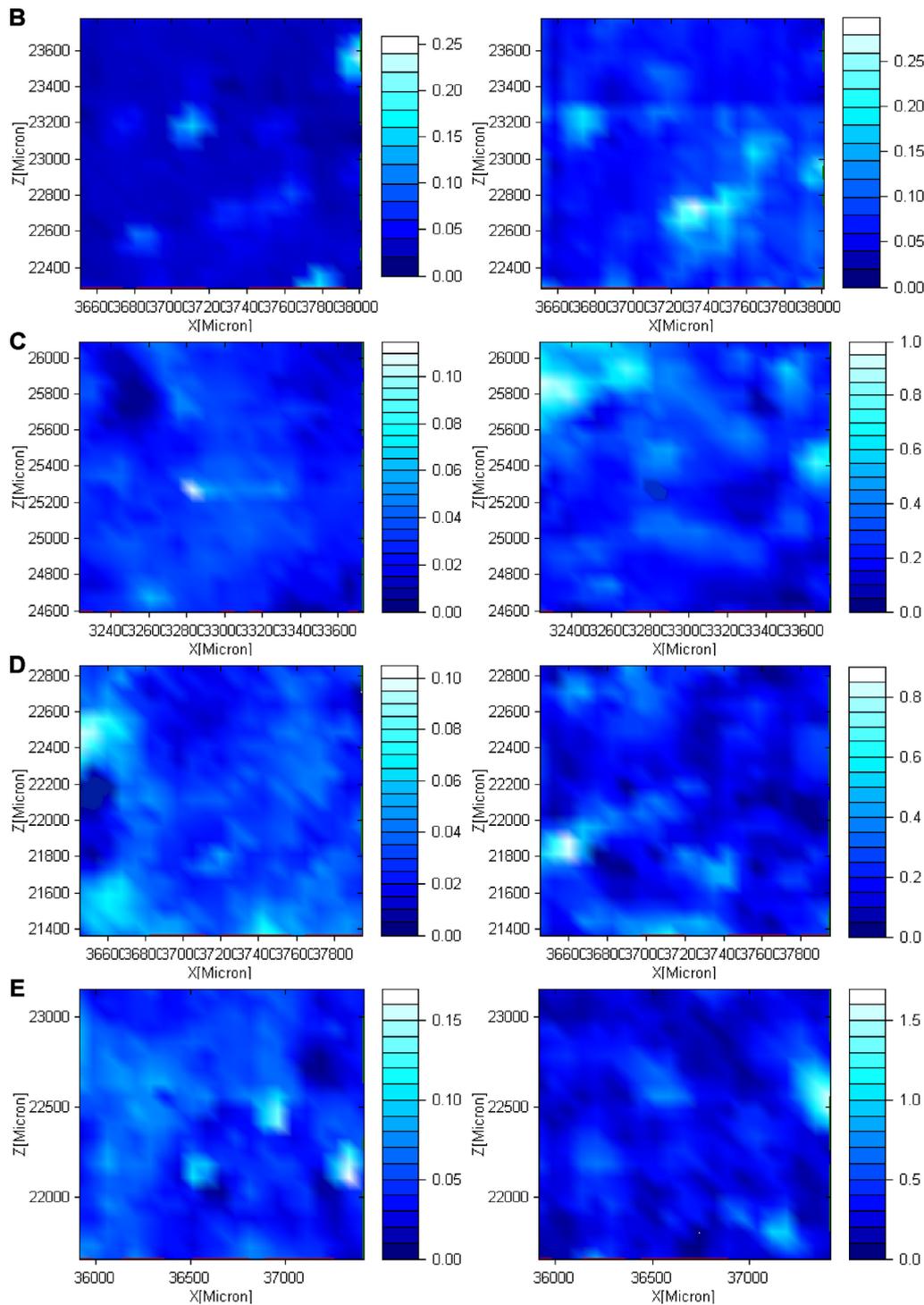


Abb. 31: FT-IR-Images der Wellenzahlenbereiche von $1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$ und $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ für A) 23 d, B) 43 d, C) 54 d, D) 70 d und E) 100 d nach Knospensprung. Die Skalierungseinheiten sind dimensionslose Integrationswerte.

Für die Imaging MALDI-TOF-MS wurden zur Vergleichbarkeit ebenfalls die summierten Intensitäten der jeweils vier intensivsten Alkane (CH), Fettsäuren (FS) und Alkylester (AE) in den Oberflächenbildern dargestellt [Abb. 32 A-E].

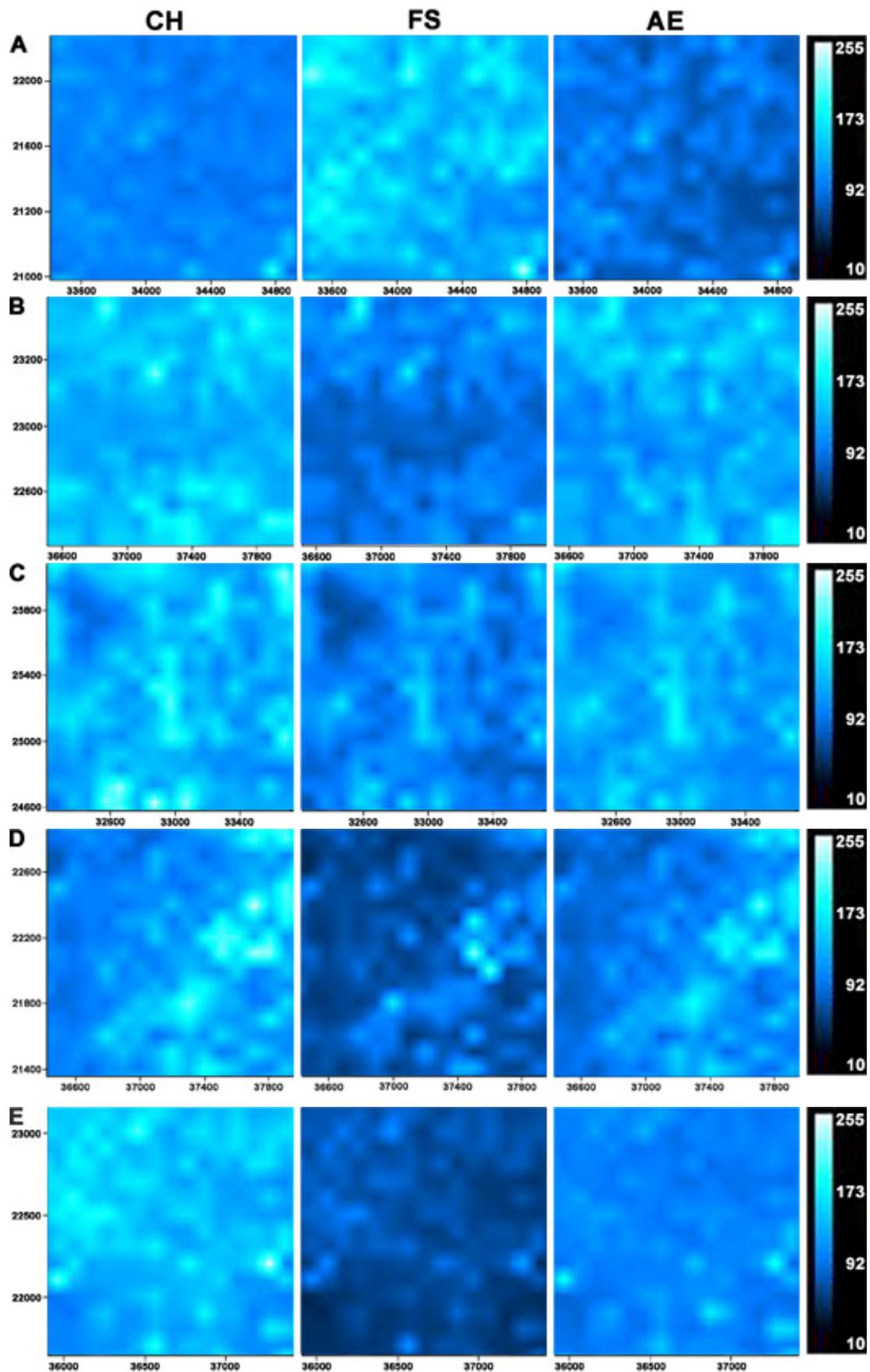


Abb. 32: MALDI-TOF-MS-Images für die Alkane, Fettsäuren und Alkylester (v.l.n.r.) bei A) t=23 d, B) t=43 d, C) t=54 d, D) t=70 d und E) t=100 d.

Wie die summierten Oberflächenimages der jeweils vier intensivitätsstärksten Alkane, Fettsäuren und Ester 23 Tage nach Knospensprung zeigten, lag auch für die individuell betrachteten Substanzklassen eine homogene Verteilung auf der Blattoberfläche vor. Ein Vergleich der Intensitäten der jeweiligen Substanzklassen spiegelte die relativ hohe Konzentration an Fettsäuren gegenüber den Alkanen und Alkylestern wider [Abb. 32A].

Ab dem 43. Tag nach Knospensprung zeigten die Alkane die höchsten Signalintensitäten und auch der Zuwachs an Alkylestern war zu beobachten [Abb. 32B]. Mit zunehmendem Alter der Blattproben stieg der Anteil an Alkanen im Epikutikularwachs bis zum vollentwickelten Blatt nach 100 Tagen. Gleichzeitig stieg auch der Anteil an Alkylestern, während die Intensitäten der Fettsäuren abnahmen [Abb. 32C-E]. Zu allen beobachteten Zeitpunkten war die relative Verteilung der Substanzklassen auf den betrachteten Blattoberflächen konstant.

Aktuelle Theorien eines enzym- oder diffusionsvermittelten pflanzlichen Wachstransportes aus dem zellulären Raum auf die Blattoberfläche^[54-56], die ein gleichmäßiges Ausbilden der Wachsschicht zur Folge hätten, werden durch die Beobachtungen einer homogenen Wachsbedeckung im Verlauf der Blattalterung gestützt. Konzentrationsunterschiede, die durch eine Sekretion der Wachsmoleküle aus dem Zellverband auf die Blattoberfläche entstehen würden, waren aber unter den hier eingesetzten Messbedingungen nicht erfassbar.

3.4 Untersuchung von Wundheilungsprozessen der pflanzlichen Kutikula

Verwundungen des Blattgewebes, speziell der Blattoberfläche als Folge mechanischer Verletzung oder unter Pathogenbefall, würden zu einem unkontrollierten Wasser- und Nährstoffverlust führen, wenn die Pflanze dem nicht mit Schließen des geschädigten Gewebes entgegen wirkt^[157]. Ein solcher, durch mechanische^[158] und mikrobielle^[159] Schädigung induzierter Wundverschluss erfolgt durch die Bildung von Suberin, einem Cutin-verwandten Biopolymer aus phenolischen und aliphatischen Monomeren. Während Cutin Bestandteil der Oberhaut aller überirdischen Pflanzenteile ist, stellt Suberin das entsprechende Pendant des Wurzelgewebes dar und tritt als polymerer Wundverschluss in allen Pflanzenteilen auf^[157, 160].

Suberin setzt sich aus phenolischen Monomeren, wie Ferulasäure, Vanillin, p-Hydroxybenzaldehyd und p-Cumarinsäure, sowie aliphatischen Bestandteilen, hauptsächlich Dicarbonsäuren, ω -Hydroxyfettsäuren, Fettsäuren und primären Alkoholen mit Kettenlängen über 20 Kohlenstoffatomen zusammen^[160, 161]. In dieses polymere Netzwerk des Suberins sind ähnlich wie beim Cutin ebenfalls kutikulare Lipide eingebettet.

Das als Wundverschluss gebildete lipophile Suberin ersetzt die zerstörte Kutikula in Struktur und Funktion, insbesondere als undurchlässige Wasserbarriere^[162], Fäulnisschutz und aufgrund des Gehalts phenolischer Verbindungen, auch als Fungizid bei Pathogenbefall^[159].

Die Rolle der epikutikularen Blattwachse bei der Wundheilung, deren mögliche Neubildung oder Anreicherung um Verwundungsstellen wurde aufgrund des Fehlens einer ortsauflösenden Oberflächenanalytik bislang noch nicht untersucht.

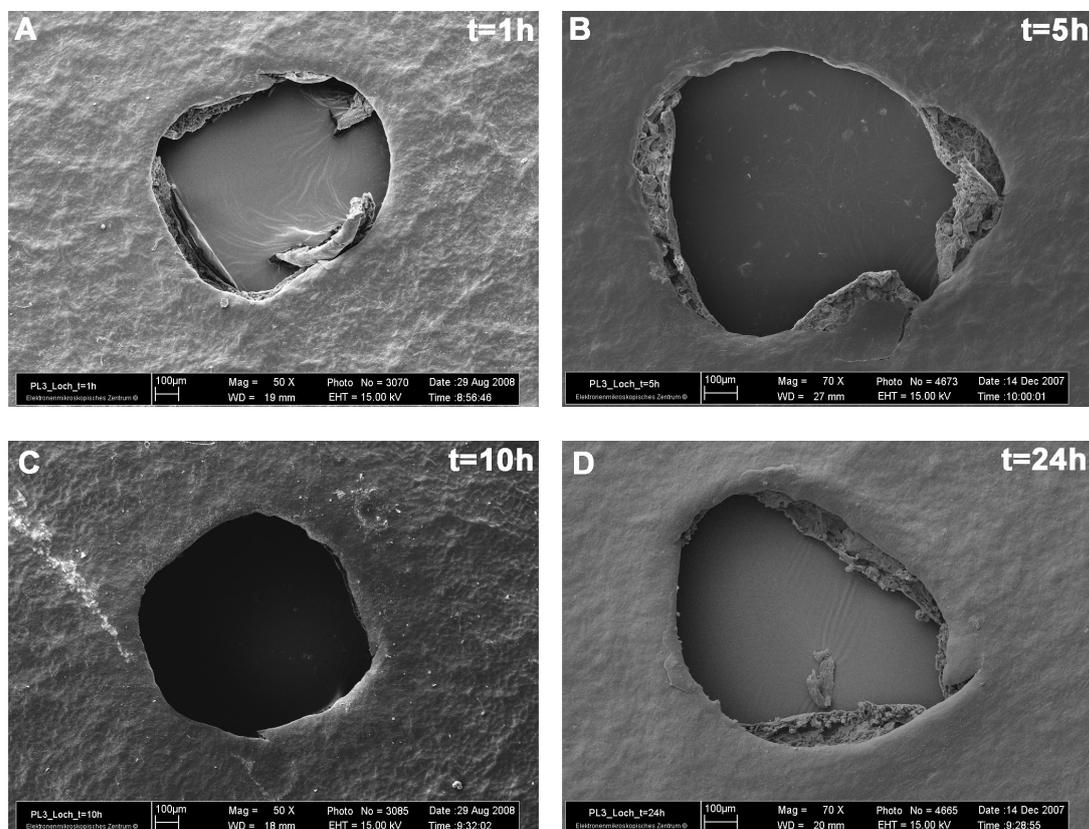
Unter Verwendung der entwickelten Imaging FT-IR- und Imaging MALDI-TOF-MS-Oberflächenanalytik sollten Veränderungen der epikutikularen Blattwachse nach einmaliger mechanischer Verwundung und als Reaktion auf Pathogenbefall untersucht werden.

3.4.1 Reaktion der Blattoberfläche auf mechanische Verwundung

Für die Untersuchung von Reaktionen der Kutikula nach mechanischer Verwundung wurden ausschließlich voll entwickelte Blätter des Kirschlorbeers verwendet. Als einmalige mechanische Verwundung wurden mit einer Kanüle von der adaxialen Blattoberfläche ausgehend Löcher von rund 1 mm Durchmesser in das Blattgewebe gestochen.

Zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden sowie 42 Tage nach der Verwundung wurde das Blattmaterial über REM untersucht und *kryo-adhesive* Abdrücke der entsprechenden Blattoberflächen auf ZnS-Träger aufgebracht. Diese wurden anschließend mittels Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS auf die Verteilung der Oberflächensubstanzen um die Läsionsstellen herum untersucht.

Abbildung 33 zeigt die REM-Aufnahmen der adaxialen Blattoberflächen nach mechanischer Verletzung zu den benannten Zeitpunkten.



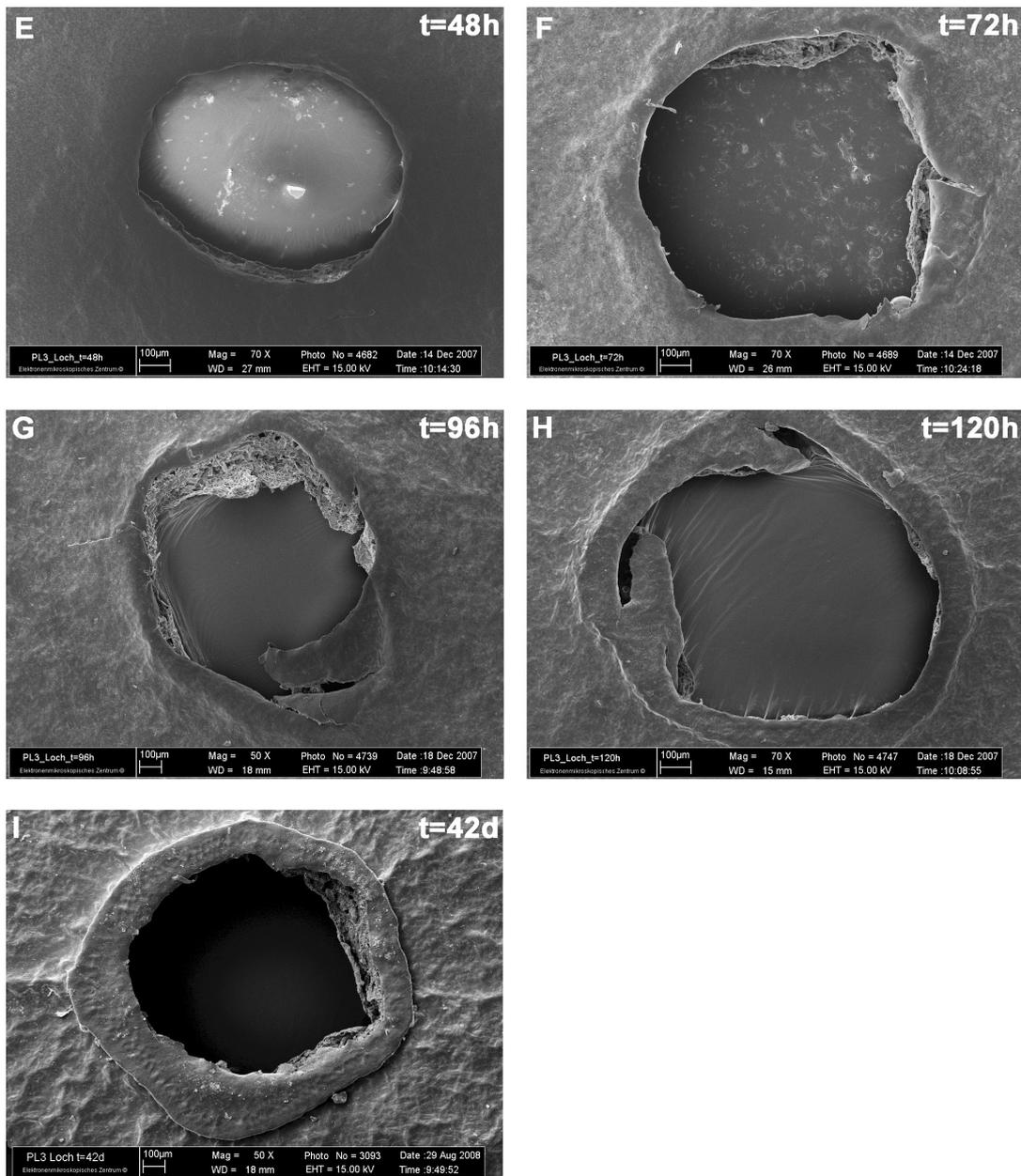


Abb. 33: REM-Aufnahmen der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers A) 1 h, B) 5 h, C) 10 h, D) 24 h, E) 48 h, F) 72 h, G) 96 h, H) 120 h und I) 42 d nach mechanischer Verwundung.

Wie die REM-Bilder zeigen, trat ab einem Zeitpunkt von 72 Stunden nach der Verwundung eine Verdickung des Gewebes um die Läsionsstelle herum auf [Abb. 33F]. Diese Beobachtung stimmte mit bisherigen Kenntnissen zur Suberinbildung überein. Mit ^{14}C -markierten Vorstufen der Suberinbiosynthese wurde an Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) die Dynamik der Wundverschlussbildung untersucht und erst ab dem dritten Tag (72 h) nach Verwundung konnte ein signifikanter Anstieg der Suberinbildung beobachtet werden^[163].

Ebenso wurde ein Anstieg von RNA und Proteinen, die die Bildung der in der Suberinbiosynthese involvierten ω -Hydroxyfettsäuredehydrogenase regulieren, ebenfalls erst drei Tage nach Verletzung nachgewiesen^[157]. Die Verdickung des Wundgewebes war also auf die Bildung des Suberins als Wundverschluss zurückzuführen.

Der Vergleich der Transmissions-FT-IR-Spektren des *kryo*-Abdrucks direkt an der Verwundungsstelle mit denen vom unverletzten Blattgewebe zeigte kein Auftreten neuer Absorptionen (Spektren siehe Anhang). Deshalb wurden für die Darstellung der Wachsverteilung nach mechanischer Verwundung die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Wellenzahlenbereiche untersucht.

Die quantitative Auswertung der Wachsbedeckung anhand der CH_3/CH_2 -Valenzen zeigte für alle betrachteten Zeitpunkte eine homogene Verteilung auf der Blattoberfläche und um die Läsion im Bereich von ca. $5\text{-}20 \mu\text{g cm}^{-2}$ [Abb. 34].

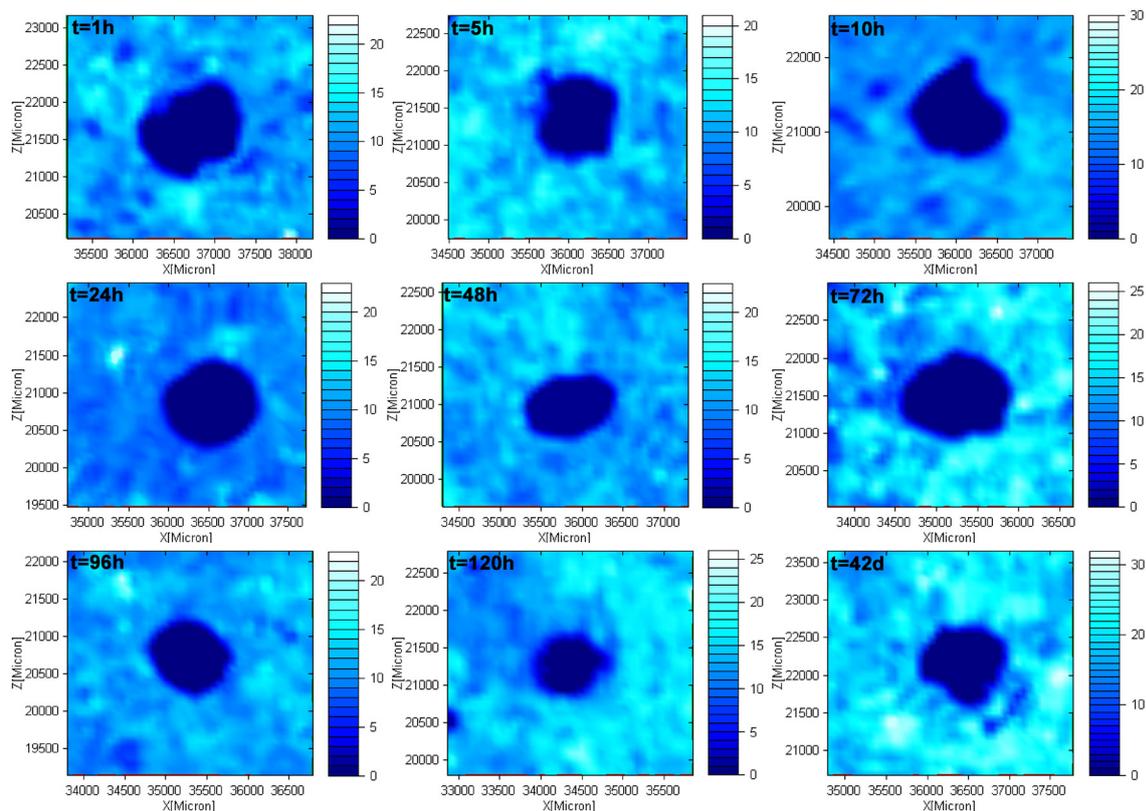
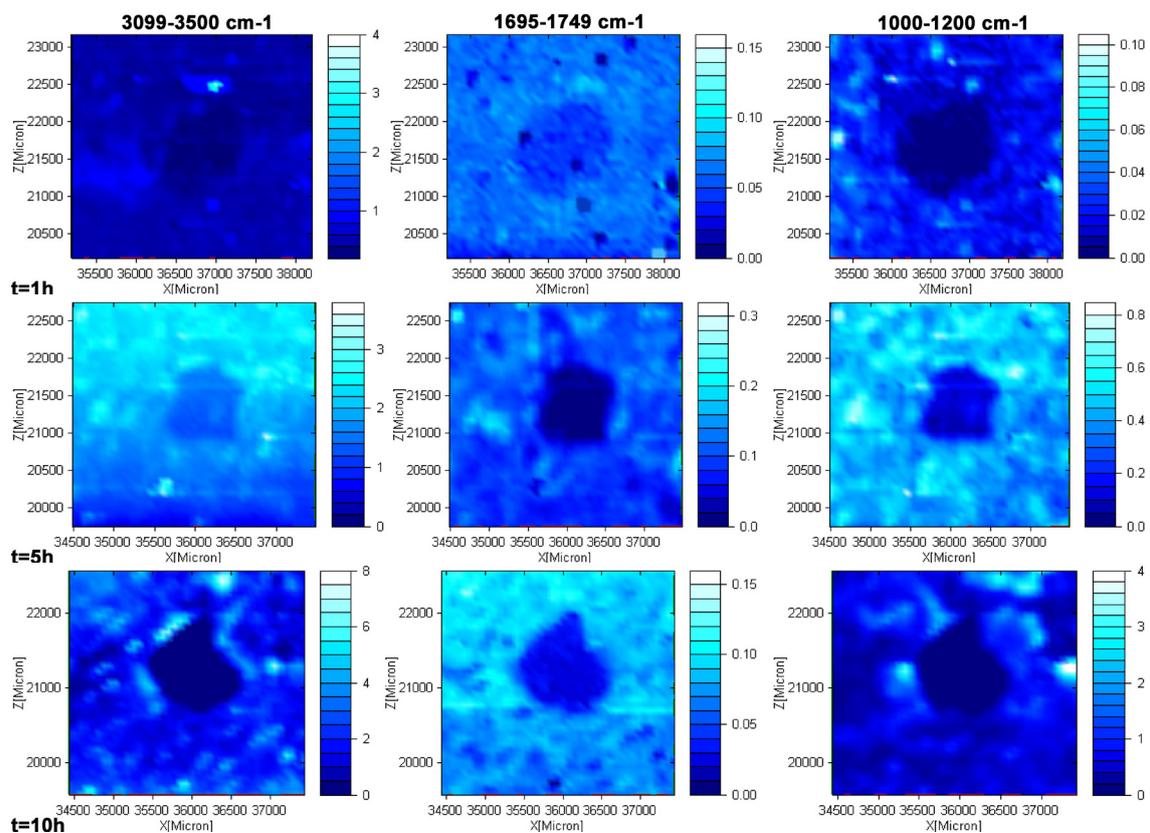


Abb. 34: Quantifizierung der Oberflächenwache des Kirschlorbeers 1 h bis 42 d nach mechanischer Verwundung anhand der CH_3/CH_2 -Streckschwingung ($2829\text{-}2975 \text{ cm}^{-1}$). Die Einheit der Skalierung beträgt $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Die Verteilung der Alkane konnte durch Fehlen einer spezifischen Absorption zwar nicht isoliert betrachtet werden, da die Kohlenwasserstoffe aber mit über 65 % den Hauptbestandteil der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers darstellten, sollte sich eine entsprechende Anreicherung auch in der Verteilung der CH_3/CH_2 -Absorptionen zeigen. Diese Absorptionen traten aber über den gesamten betrachteten Zeitraum gleichmäßig verteilt auf der Blattoberfläche auf.

Für die Carbonylschwingung ($1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$) ließ sich ebenso wie für das gesamte Wachsgemisch eine gleichbleibend homogene Verteilung beobachten. Die Auswertung der Imaging FT-IR für die OH-Valenz ($3099\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) und die C-O-Einfachbindung ($1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) hingegen zeigte ab dem dritten Tage nach Verwundung ($t=72\text{ h}$) eine erhöhte Absorption am Rand der Läsion [Abb. 35]. Mit fortschreitender Alterung des Wundgewebes ließ sich diese Anreicherung weiter beobachten ($t=96\text{ h}$ und 120 h) und erst 42 Tage (1108 h) nach Verwundung trat diese Akkumulation um das geschädigte Gewebe herum nicht mehr auf.



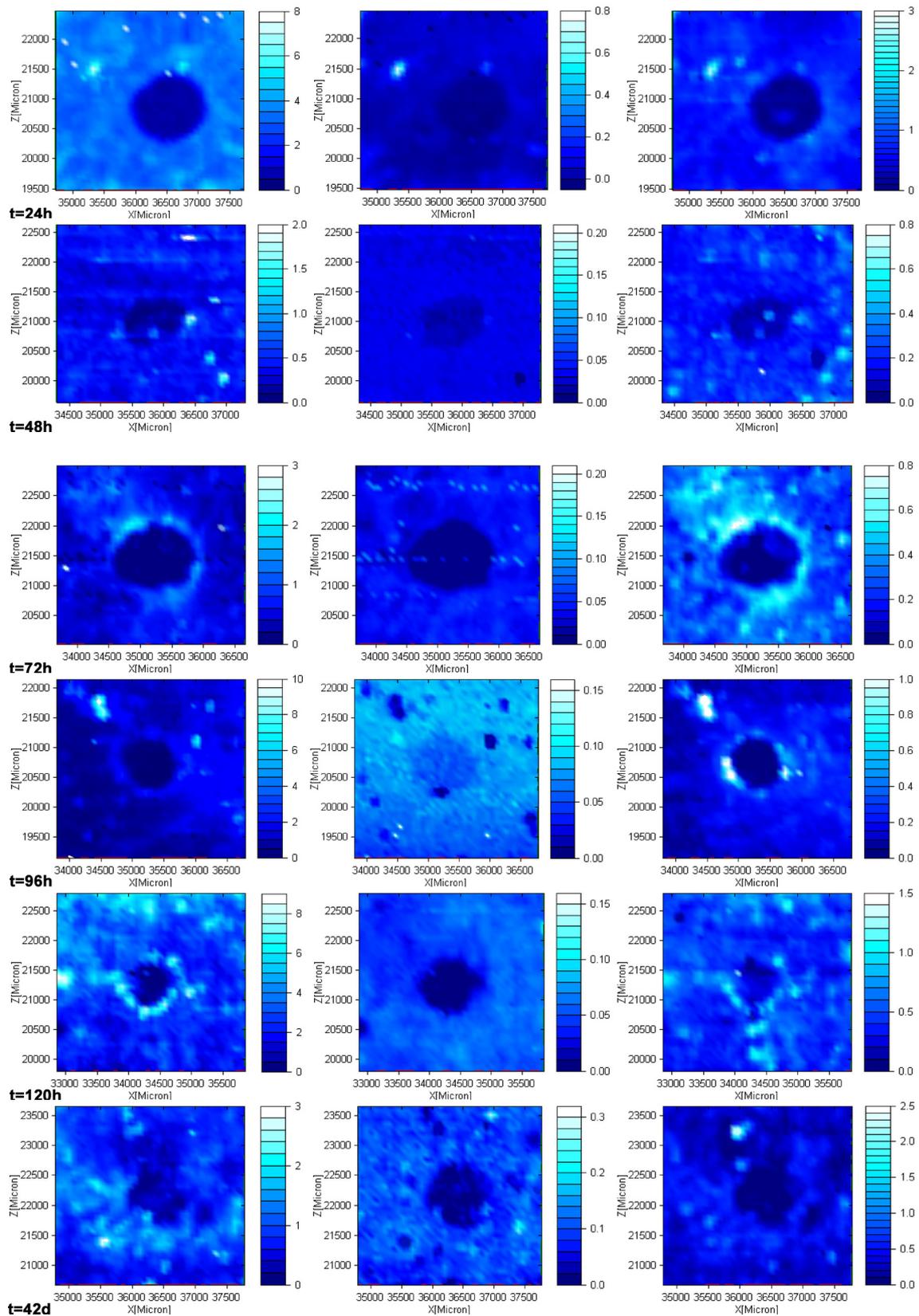
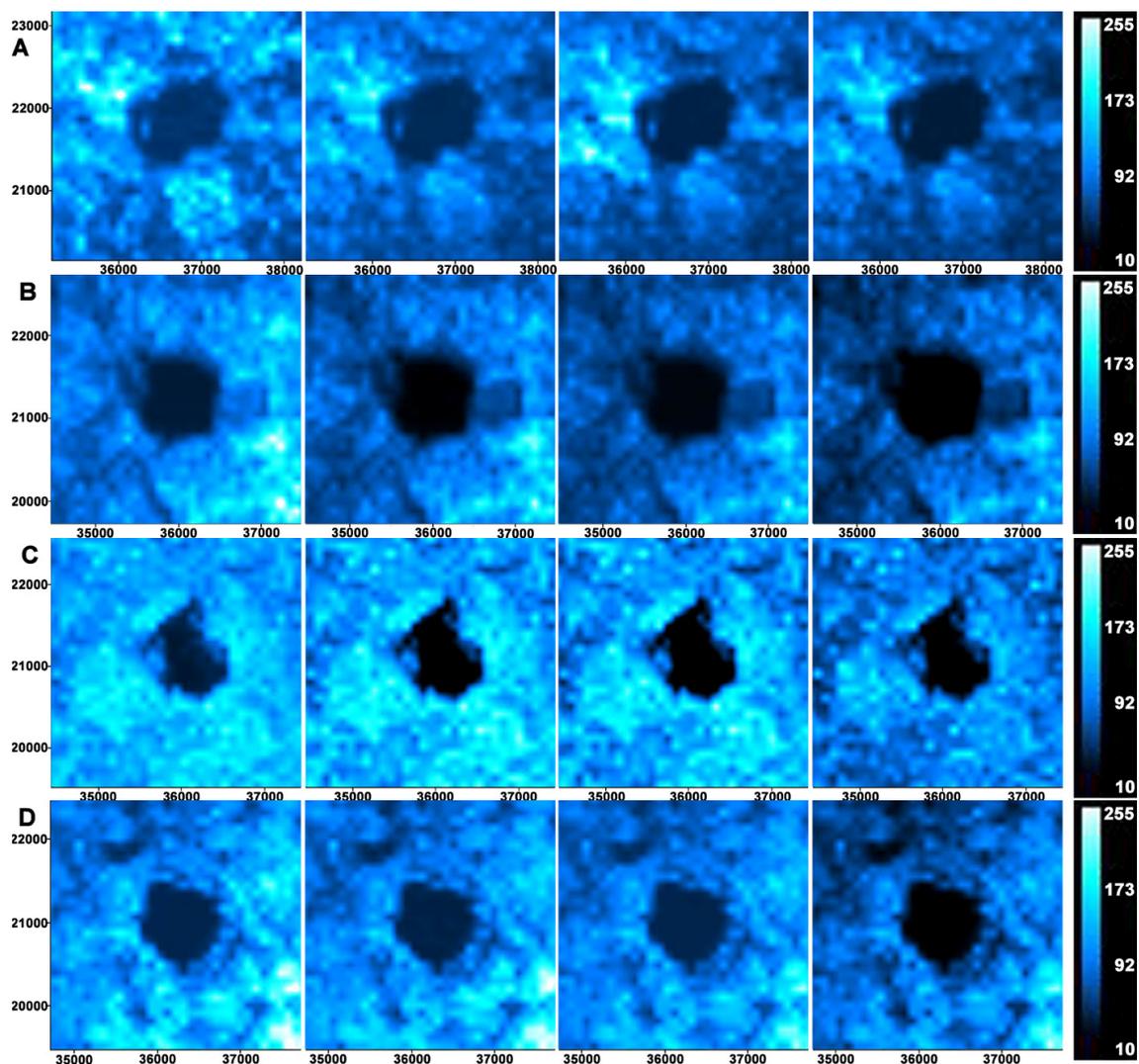


Abb. 35: FT-IR-Images für $3099\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, $1695\text{--}1749\text{ cm}^{-1}$ und $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ auf der Blattoberfläche des Kirschlorbeers 1 h bis 42 d nach mechanischer Verwundung. Die Skalierungseinheiten sind dimensionslose Integrationswerte.

Die Intensitätszunahme der OH- und C-O-Absorptionen ließ sich mit dem Erscheinen von Fettsäuren oder Alkoholen erklären. Die Überlagerung der Carbonylschwingungen von Estern und Säuren erschwerte die Beobachtung von Unterschieden in der Oberflächenverteilung der Fettsäuren anhand der C=O-Absorption. Eine definierte Zuordnung der sich um die Wundstelle anreichernden Verbindungen erlaubte nur die Kombination mit der Imaging MALDI-TOF-MS.

Die MALDI-TOF-Massenspektren direkt an den Verwundungsstellen zeigten kein Auftreten neuer Signale, was anstelle einer Neubildung von Substanzen auf eine Anreicherung schon vorhandener Verbindungen schließen ließ (Spektren siehe Anhang). Um dies zu prüfen, wurde wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben die Intensitätsverteilung der jeweils vier Hauptvertreter der Alkane, langkettigen Ester, n-Alkohole und Fettsäuren als Summe der Einzelsignale ausgewertet [Abb. 36].



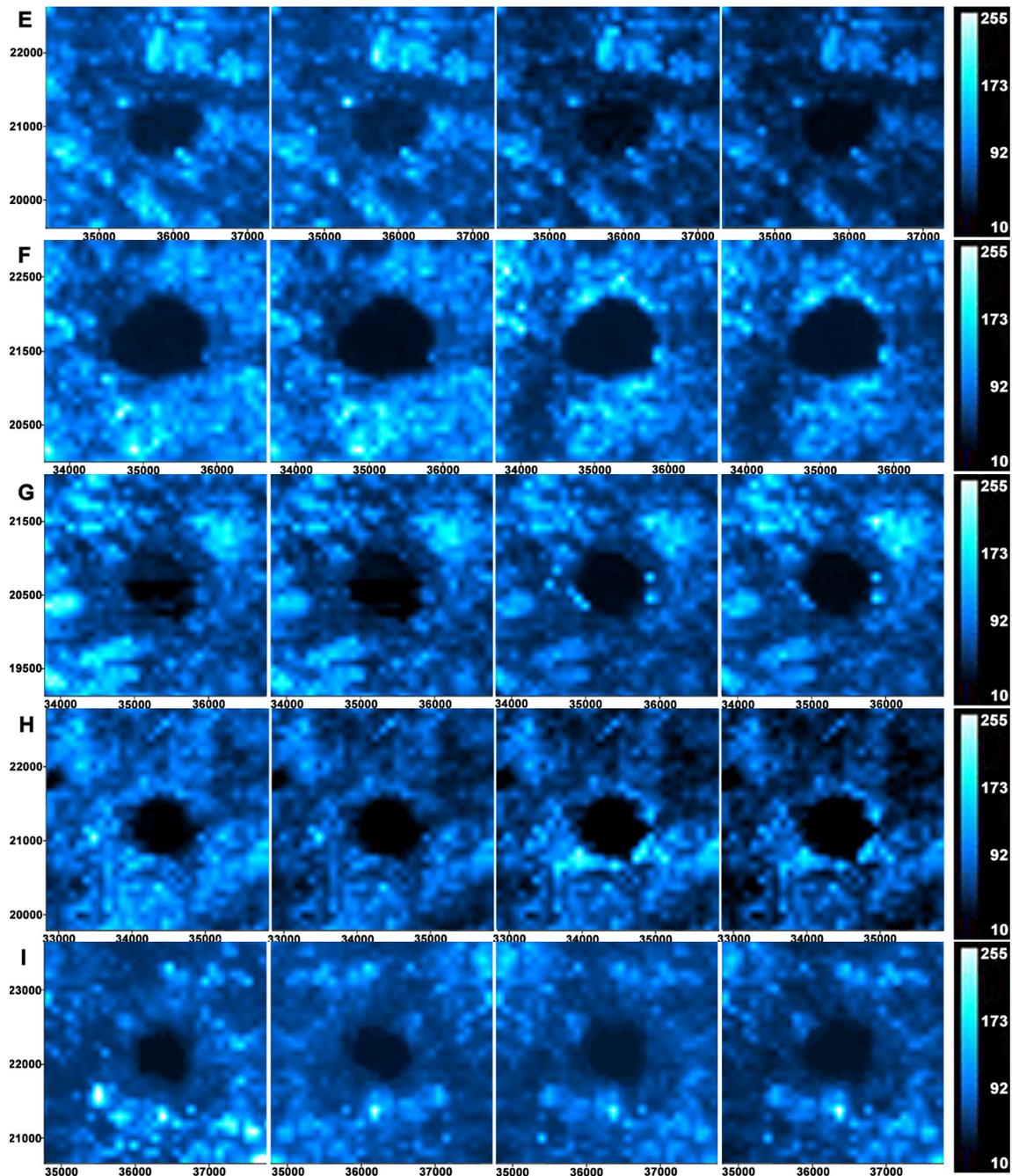


Abb. 36: MALDI-Images der Alkane, Alkylester, n-Alkohole und Fettsäuren (v.l.n.r.) für die Oberflächenverteilung der Wachse des Kirschlorbeers jeweils A) 1 h, B) 5 h, C) 10 h, D) 24 h, E) 48 h, F) 72 h, G) 96 h; H) 120 h und I) 42 d nach mechanischer Verwundung.

Die Imaging MALDI-TOF-MS zeigte ab $t=72$ h für die primären Alkohole und Fettsäuren eine Akkumulation um die Verwundungsstelle, was mit den Ergebnissen der Imaging FT-IR korrelierte. Für die Alkane und Alkylester hingegen ließ sich keine spezifische Verteilung in Abhängigkeit des Gewebezustandes beobachten, obwohl diese beiden Substanzklassen zusammen die Hauptmenge der Epikutikularwache des Kirschlorbeers darstellten.

Das zeitliche Auftreten der Alkohol- und Fettsäureanreicherungen um die Verwundungsstellen ab dem dritten Tag ließ einen Zusammenhang zur Suberinbiosynthese vermuten. Untersuchungen an Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.)^[158] und an Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L.)^[164] zeigten, dass nach Verwundung gebildetes Suberin ebenfalls von einer Wachsschicht bedeckt war. Diese Wachse besaßen dabei eine ähnliche Zusammensetzung hinsichtlich auftretender Substanzklassen und Präferenz bestimmter Homologe wie die unbeschädigte Blattoberfläche.

Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass die Anreicherung von langkettigen Alkoholen und Fettsäuren eher in der Bildung des Wundverschlusses (Suberin) begründet war, denn bei einer Neubildung der epikutikularen Blattwachse als Reaktion auf die Verwundung hätte auch ein Anstieg an Alkanen und Alkylestern um die Verwundung herum beobachtet werden müssen.

In das polymere Grundgerüst des Suberins sind neben aromatischen Bausteinen auch aliphatische Verbindungen wie Dicarbonsäuren, ω -Hydroxyfettsäuren, einfache Fettsäuren und n-Alkohole über Esterbindungen eingebaut. Während die aromatischen „Bausteine“ des Suberins über Kohlenhydrateinheiten mit der Zellwand verbunden sind, bilden die bifunktionellen Aliphaten kovalent gebundene Polyesterketten, deren Endgruppen Fettsäuren und n-Alkohole mit Kettenlängen über 20 Kohlenstoffatomen darstellen^[157, 159, 161, 164]. Eine mögliche Erklärung für die erhaltenen Imaging FT-IR- und Imaging MALDI-TOF-MS-Ergebnisse wäre eine im Verlauf der Suberinbiosynthese erfolgte Anreicherung dieser endständigen Monomere auf der neu gebildeten Blattoberfläche, was auch die Parallelität zur Suberinbildung 72 h nach der Verletzung erklären würde.

Diese Annahme wird von dem zeitlich begrenzten Auftreten der Anreicherungen um das Wundgewebe gestützt. 42 Tage nach der Verletzung ließen sich weder über Imaging FT-IR noch Imaging MALDI-TOF-MS solche Akkumulationen beobachten. Quantitative Untersuchungen an Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.) zeigten, dass die Bildung des Suberins bereits 7-8 Tage nach der Schädigung abgeschlossen war^[161, 165]. Der Einbau von langkettigen Fettsäuren und Fettalkoholen in das polymere Gerüst des Suberins würde das „Verschwinden“ der zunächst beobachteten Anreicherung begründen.

Dass bis heute grundlegende Prozesse der Suberinbiosynthese, wie beispielsweise die Polymerisation der einzelnen Monomere oder der Transport bzw. der Aufbau auf der Blattoberfläche ungeklärt sind^[166], erschwert die Interpretation der beobachteten Lipidanreicherungen um die Wundstelle.

Um den Ursprung und die Identifikation der auftretenden Strukturen eindeutig aufzuklären, sind eine getrennte Isolation des gebildeten Suberins und der kutikularen Wachse sowie die Untersuchung der Veränderungen in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung im Verlauf der Wundheilung nötig. Unter Einsatz der hier entwickelten Oberflächenanalytik konnten erstmalig Reaktionen der Blattoberfläche des Kirschlorbeers auf mechanische Verwundung ortsaufgelöst dargestellt werden.

3.4.2 Reaktion der Blattoberfläche auf Pilzbefall

Einige der verwendeten Kirschlorbeerpflanzen zeigten insbesondere im Frühjahr auf den Blattoberflächen gelb-braune Flecken, deren Blattgewebe im Krankheitsverlauf von den Pflanzen abgestoßen wurde. Das Abstoßen dieses Gewebes führte zu einer Vielzahl an Löchern im Blattmaterial, die von braunem, nekrotischem Gewebe umrandet waren [Abb. 37A]. Mikroskopische Aufnahmen der Blattoberfläche zeigten konidien- und hyphen-ähnliche Strukturen, die auf einen Pilzbefall schließen ließen [Abb. 37B & C].

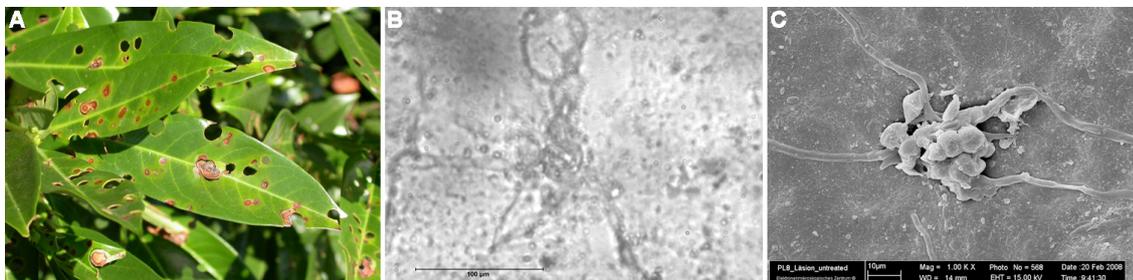


Abb. 37: Schrotschußkrankheit am Kirschlorbeer A) Blätter mit den typischen Nekrosen (aus BDG, Bund Deutscher Gartenfreunde e.V.), B) durchlichtmikroskopische Aufnahme von Pilzstrukturen im *kryo*-Abdruck auf dem ZnS, C) REM-Aufnahme des Pilzorganismus auf der Blattoberfläche.

Anhand dieser Symptome wurde eine Erkrankung der Versuchspflanzen mit der „Schrotschußkrankheit“ vermutet, die durch den Pilz *Trochila laurocerasi* verursacht wird^[167, 168]. Diese Pilzinfektion wurde von der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL, Erfurt, Deutschland) über die Zuordnung der Konidien auf dem befallenen Blattmaterial bestätigt.

Chemische Prozesse der Blattoberfläche, die Funktion der Epikutikularlipide in Abwehrreaktionen oder das Auftreten bestimmter Verbindungen in Folge von Pilzbefall waren bislang kaum untersucht. Die hier entwickelte Oberflächenanalytik bot erstmals die Möglichkeit, die Oberfläche befallener Blätter auf lokale Veränderungen der Epikutikularwachse und das Auftreten möglicher Abwehrstoffe hin zu untersuchen. Dafür wurde die Wachsschicht der Blattoberflächen infizierter Gewebestellen *kryo-adhesiv* auf das ZnS-Substrat übertragen und mittels Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS analysiert. Abbildung 38 zeigt die untersuchte Blattoberfläche, den entsprechenden Wachsabdruck auf dem ZnS-Substrat und die REM-Aufnahme einer entsprechenden Pilzläsion.

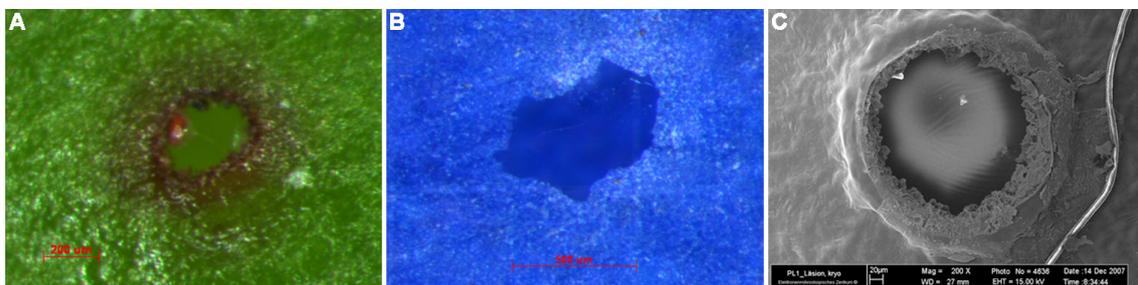


Abb. 38: Mikroskopische Aufnahmen A) der pilzbedingten Blattläsion, B) des entsprechenden *kryo*-Abdrucks auf dem ZnS, C) REM-Aufnahme eines Blattes mit Infektionsstelle.

Wie den mikroskopischen Aufnahmen zu entnehmen ist, bildete die Pflanze ähnlich wie bei der rein mechanischen Verwundung um das geschädigte Gewebe eine Verdickung. Diese Verdickung diente der Abgrenzung des gesunden Gewebes^[168] und einer Eindämmung der Infektion.

Neben dieser Verdickung des Gewebes ließ sich auch eine Anreicherung von Oberflächensubstanzen um die Läsionsstelle beobachten, wie der Intensitätsverteilung der CH_3/CH_2 - Absorption zu entnehmen war [Abb. 39].

Die quantitative Auswertung der Absorptionsintegrale zeigte einen Anstieg der Wachsbedeckung um die Wundstelle herum auf $40\text{-}50 \mu\text{g cm}^{-2}$, was etwa dem Doppelten der auf der ungeschädigten Lamina vorhandenen Bedeckung von $15\text{-}25 \mu\text{g cm}^{-2}$ entsprach.

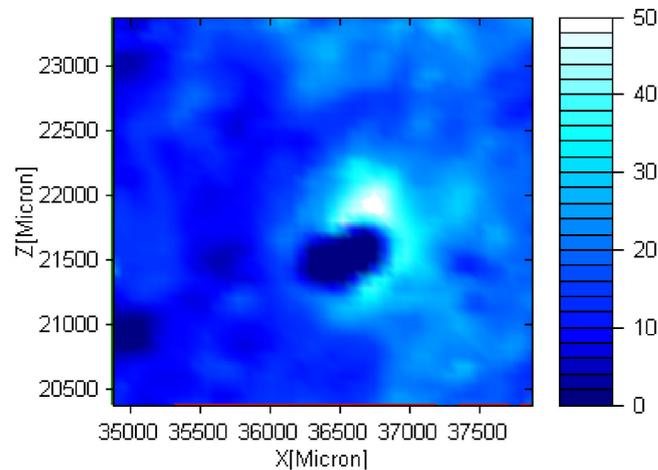


Abb. 39: Quantifizierung der Kirschlorbeerwache über die CH_3/CH_2 -Streckschwingung ($2829\text{-}2975 \text{ cm}^{-1}$) um die pilzbedingte Läsion. Die Einheit der Skalierung beträgt $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Neben dieser Akkumulation trat auch eine Änderung in der Wachszusammensetzung auf, wie der Vergleich der FT-IR-Spektren der Oberflächenwache auf erkranktem und gesundem Gewebe zeigte [Abb. 40].

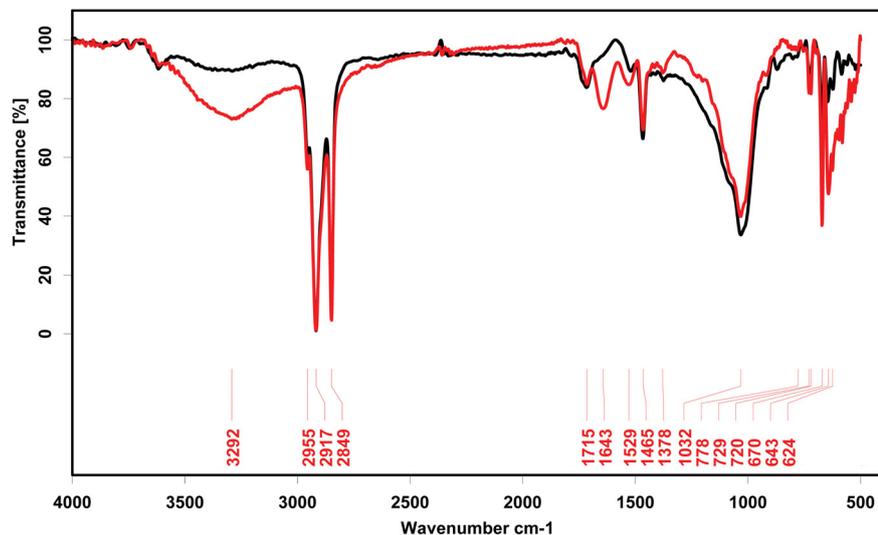


Abb. 40: FT-IR-Spektrum des *kryo-adhesiven* Oberflächenabdruckes von einem ungeschädigten Blattbereich (schwarz) und der Infektionszone am Rand der Läsion (rot).

Neben einem Intensitätsanstieg der OH-Absorption ($3100\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$) ließ sich das Auftreten von zwei neuen Absorptionen im Bereich von 1640 cm^{-1} und 1530 cm^{-1} im Wachsgemisch des geschädigten Blattgewebes beobachten.

Über Imaging FT-IR wurde die Verteilung der OH-Schwingung ($3099\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$), der neu auftretenden Absorptionen ($1602\text{-}1664\text{ cm}^{-1}$, $1502\text{-}1564\text{ cm}^{-1}$), der Carbonylschwingung ($1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$) und der C-O-Einfachbindung ($1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) im Vergleich zur CH_3/CH_2 -Absorption untersucht [Abb. 41].

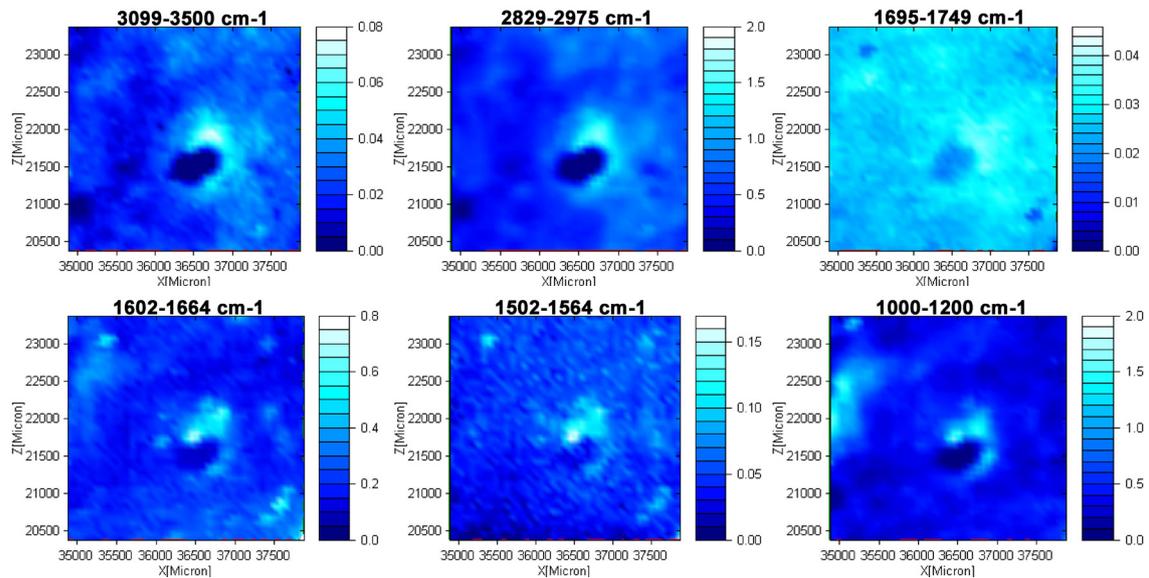


Abb. 41: FT-IR-Images für $3099\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, $2829\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$, $1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$, $1602\text{-}1664\text{ cm}^{-1}$, $1502\text{-}1564\text{ cm}^{-1}$ und $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ für die adaxiale Blattoberfläche des Kirschlorbeers mit Pilzinfektion. Die Skalierungseinheiten sind dimensionslose Integrationswerte.

Bis auf die Carbonylschwingung ließ sich für alle betrachteten Banden eine Anreicherung um die Läsion beobachten, nur die Intensitätsverteilung für den Bereich von $1695\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$ zeigte keine Akkumulation um die Wundstelle. Demgegenüber wiesen die OH- und C-O-Absorptionen ($3099\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) ebenso wie die Banden bei 1640 cm^{-1} und 1530 cm^{-1} eine starke Anreicherung um das geschädigte Gewebe auf. Die Verteilung dieser Absorptionen war identisch zu der des gesamten Wachsgemisches, was durch die CH_3/CH_2 -Valenz beschrieben wurde [Abb. 39].

Die Veränderungen der OH- und C-O-Absorptionen ebenso wie die Lage der neu auftretenden Banden konnte mit Kohlenhydraten oder Alditolen begründet werden.

Der Vergleich der FT-IR-Spektren von D-(+)-Glucose und D-(+)-Arabinitol als Referenzen bestätigte dies. Beide Verbindungen zeigten starke Absorptionen der OH- und C-O-Schwingungen ebenso wie das Auftreten von Absorptionsbanden im Bereich von 1540 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} (Spektren siehe Anhang).

Die Ergebnisse aus der (Imaging) MALDI-TOF-MS ermöglichten durch Bestimmung der Molekülmassen eine genauere Zuordnung der angereicherten Substanzen. Zunächst wurden Einzelspektren des Oberflächenabdrucks im Bereich des ungeschädigten Blattmaterials und der Läsionsstelle aufgenommen [Abb. 42].

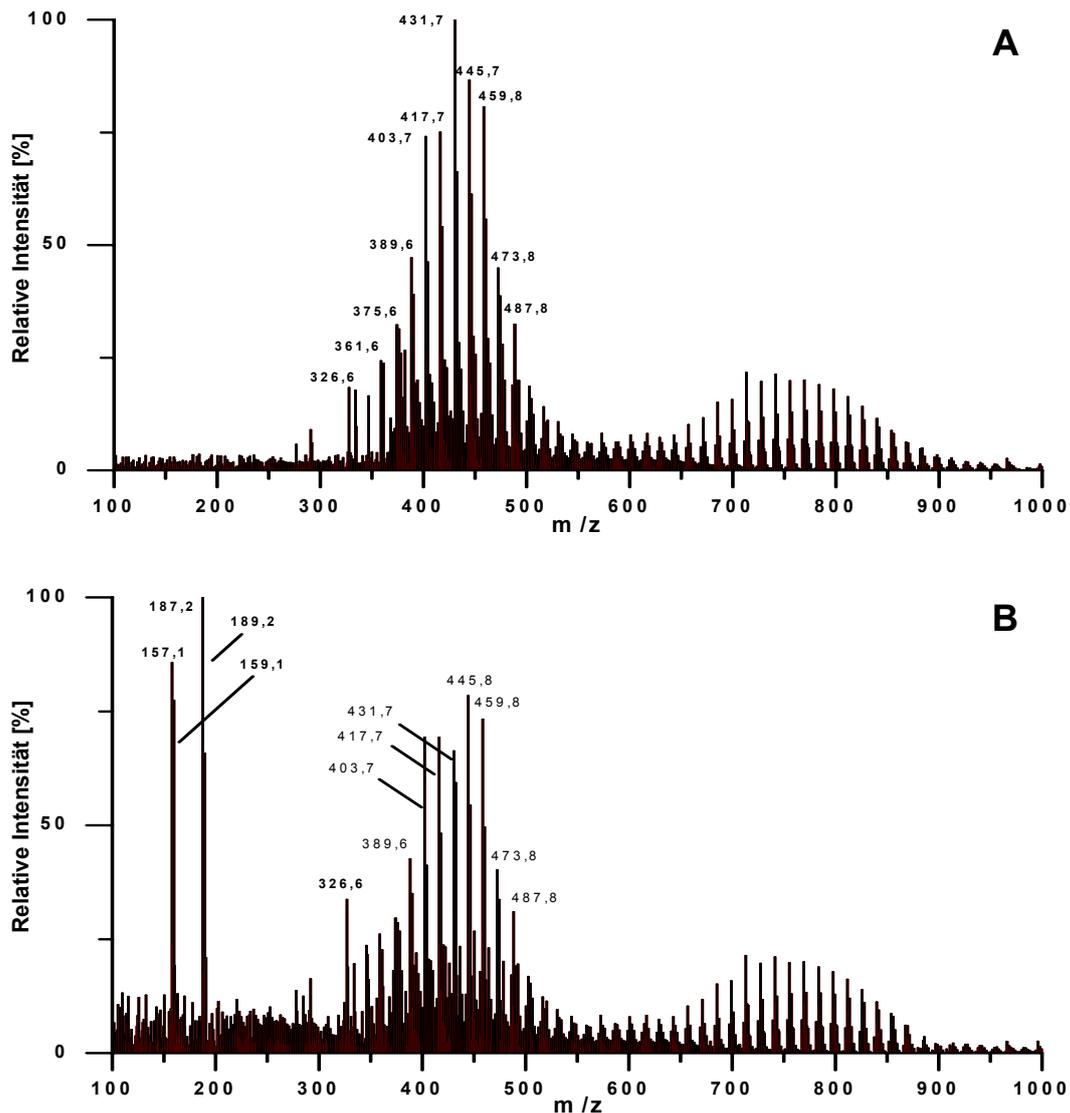


Abb. 42: MALDI-TOF-MS-Spektren des *kryo-adhesiven* Oberflächenabdrucks des Kirschlorbeers: A) gesundes Blattgewebe, B) nekrotisches Gewebe am Rand der Läsion.

Wie die MALDI-TOF-MS-Spektren für die Pilzläsion am Kirschlorbeer zeigten, waren die Wachssignale für das unbeschädigte Blattmaterial und den Randbereich der Läsion vergleichbar und zeigten die zu erwartenden Ionencluster um 400 und 700 Da.

Im Spektrum des Oberflächenabdruckes der Nekrose traten zusätzlich vier weitere Signale auf. Diese Signale bei 157 Da, 159 Da, 187 Da und 189 Da zeigten in dem betrachteten Massenbereich die höchsten Intensitäten und waren mit der bekannten Wachszusammensetzung des Kirschchlorbeers nicht erklärbar.

Die Betrachtung der Oberflächenverteilung dieser Strukturen zeigte eine starke Anreicherung um die Läsion [Abb. 43A], während die epikutikulären Wachse homogen über die Probenfläche verteilt vorlagen [Abb. 43B].

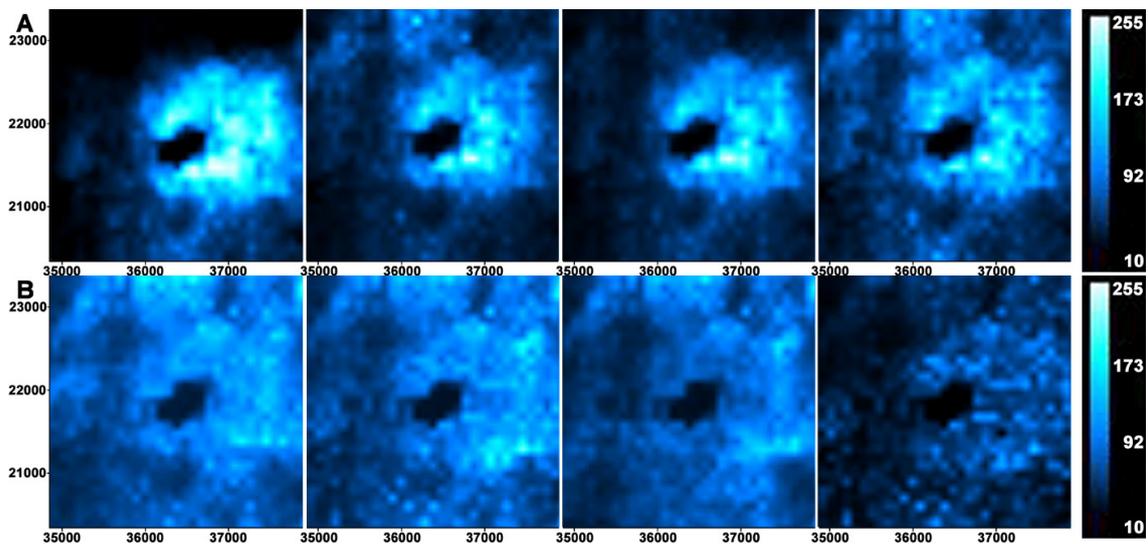


Abb. 43: MALDI-TOF-MS-Images A) für m/z 157 Da, 159 Da, 187 Da, 189 Da (v.l.n.r.) und B) der Alkane, Alkylester, n-Alkohole und Fettsäuren (v.l.n.r.) des *kryo*-Abdruckes der Pilzläsion am Kirschchlorbeer.

Die um die Wundstelle akkumulierten ^7Li -Adduktionen bei 157 Da und 187 Da konnten, wie bereits aus der FT-IR-Analyse vermutet, Zuckern, genauer Pentosen ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, $150,13 \text{ g mol}^{-1}$) bzw. Hexosen ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $180,06 \text{ g mol}^{-1}$) zugeordnet werden, die Ionen der Massen 159 Da und 189 Da den entsprechenden Zuckeralkoholen ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$, $152,14 \text{ g mol}^{-1}$, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$, $182,17 \text{ g mol}^{-1}$).

Zur Identifikation der hypothetischen Kohlenhydrate wurde die Oberfläche von nekrotischem Blattgewebe über *kryo-adhesive* Extraktion mit Wasser isoliert und mittels GC-MS-Analytik und hochauflösender MS untersucht.

Über die GC-MS-Analyse des Oberflächenextraktes konnten Arabinose, Fructose und Glucose, sowie die Zuckeralkohole Sorbitol, Inositol und Arabinitol anhand der Massenspektren und Retentionszeiten durch den direkten Vergleich mit Referenzverbindungen identifiziert werden.

Über die durch hochauflösende MS ermittelten Molekülmassen wurden Glucose, Fructose, Arabinose, Sorbitol, Arabinitol und Inositol bestätigt.

Mit diesen Ergebnissen konnten die im MALDI-TOF-MS beobachteten Signale bei 157 Da der Arabinose, bei 159 Da dem Arabinitol, bei 187 Da der Glucose, Fructose und dem Inositol, sowie bei 189 Da dem Sorbitol zugeordnet werden.

Um die Ionisierbarkeit dieser Polyhydroxyverbindungen in der MALDI-TOF-MS unter Verwendung der $^7\text{LiDHB}$ zu untersuchen, wurde das LOD von D-(+)-Glucose als Modellsubstanz bestimmt. Dazu wurden Standardlösungen im Bereich von 1 mM bis 5 μM hergestellt. Jeweils 1 μl wurde wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, auf das ZnS-Substrat aufgebracht und über MALDI-TOF-MS untersucht.

Für die Laserenergie von 154 μJ , die auch bei der Analyse der Wachsabdrücke eingesetzt wurde, zeigte das Zuckersignal in dem betrachteten Konzentrationsbereich gute Linearität [Abb. 44], was sich in dem Korrelationskoeffizient von 0,9897 darstellte.

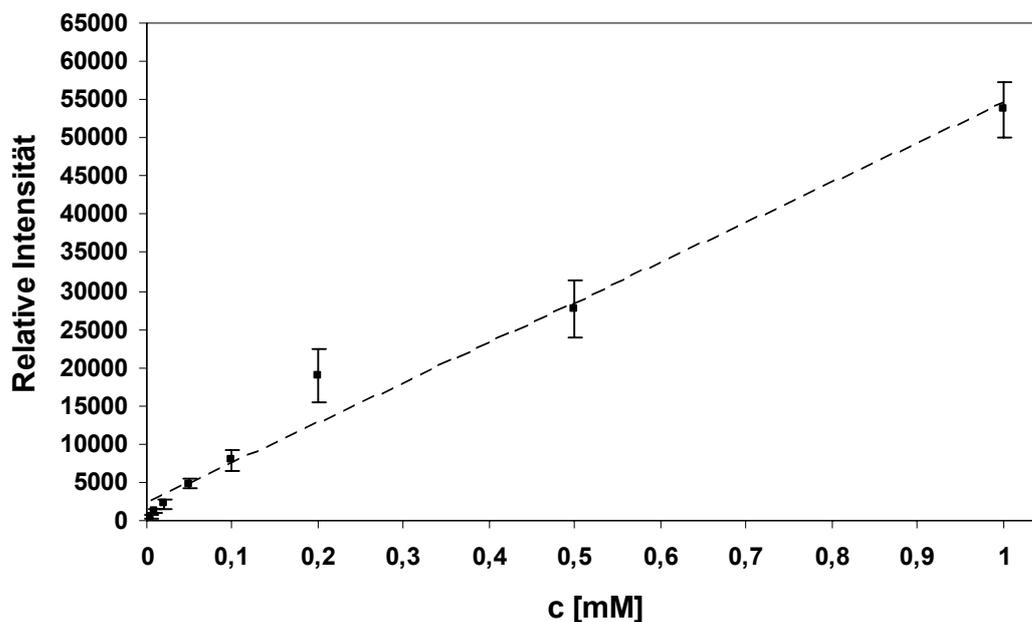


Abb. 44: Relative Intensitäten der ^7Li -Adduktionen und lineare Regression für die D-(+)-Glucose im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 5 μM .

Ebenso wie bei dem Alkylester konnten auch bei dem Zucker bereits bei einer verminderten Laserenergie von 126 μJ (80%) intensitätsstarke Adduktionen ($[\text{M}+^7\text{Li}]^+$, 187 Da) beobachtet werden.

Das LOD für die D-(+)-Glucose unter Verwendung des $^7\text{LiDHB}$ betrug $5\ \mu\text{M}$, was einer aufgetragenen Masse von ca. $1\ \text{ng}$ bzw. einer Oberflächenbedeckung von $115\ \text{ng cm}^{-2}$ entsprach. Die relativ große Anzahl polarer funktioneller Gruppen schien die Ursache für die leichte Ionisierbarkeit und höhere Nachweisgrenze des Zuckers gegenüber den langkettigen Wachsen zu sein.

Für eine eindeutige Zuordnung der Zucker wäre es nötig, die genaue Konfiguration der OH-Gruppen und die Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom aufzuklären, was mit den hier eingesetzten Analysemethoden nicht möglich war.

Da Zucker und Zuckeralkohole keine Bestandteile der gesunden unbeschädigten Kutikula waren, musste das Auftreten dieser polaren Verbindungen auf der Blattoberfläche des Kirschlorbeers eine Folge des Pilzbefalls mit *Trochila laurocerasi* sein.

Glucose, Arabinose und Fructose könnten im Verlauf der Infektion durch Saccharose-, Kutikula- und Zellwand-abbauende Enzyme des Pilzes freigesetzt werden^[169-172]. Die Zerstörung der pflanzlichen Kutikula und der Zellwände erleichtert dem Pilz einerseits das Eindringen in die Pflanze^[64, 173] und ermöglicht andererseits den Zugang zu energiereichen Zuckermonomeren zur Deckung des eigenen Energiebedarfs^[174].

Amygdalin, ein Cyanoglucosid des Kirschlorbeers^[175], besitzt toxische Eigenschaften gegenüber Mikroorganismen und Parasiten^[176]. Die Hydrolyse des Amygdalins durch fungale Glucosidasen würde ebenfalls Glucose freisetzen und könnte somit Teil der pathogenen Abwehr des Pflanzentoxins sein^[177-179].

Inositol tritt in Form seiner Phosphorsäureester in höheren Pflanzen als Phosphatspeicher auf. Jüngste Studien an Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) zeigen außerdem, dass Inositolpolyphosphate bereits kurze Zeit nach mechanischer Verwundung in der Pflanze gebildet werden. Man vermutet außerdem einen Einfluss dieser Verbindungen auf die Jasmonsäureregulierung^[180]. In Pilzen dient Inositolphosphat zum Aufbau von Sphingolipiden^[181] und Membranen, weshalb sie lebensnotwendig für den Pilzorganismus^[182] sind.

Inositol könnte also entweder durch die Zerstörung des Pilzgewebes bei der *kryoadhesiv*-Extraktion freigesetzt werden oder als pflanzliche Reaktion auf die Verwundung auftreten.

Sorbitol kommt in den Vakuolen, im Stroma und im Cytosol pflanzlicher Zellen vor, wird allerdings in weit höheren Konzentrationen im Phloem beobachtet^[183-185]. Insbesondere in Vertretern der *Prunus*-Spezies dient es neben der Saccharose als Kohlenstoff- und Energie-Transporter^[184]. Das am Kirschlorbeer nach Pilzbefall beobachtete Sorbitol könnte demnach in Folge der Gewebeerstörung aus dem Pflanzeninneren an die Blattoberfläche gelangt sein und vom Pathogen als Energiequelle genutzt werden.

Arabinitol ist in den Sporen vieler Pilze zu finden. Die Rolle von D-Arabinitol in der Pathogen-Wirt-Interaktion wurde an dem Rost-Pilz *Uromyces fabae* nach Infektion von Ackerbohnen (*Vicia faba*) untersucht^[186]. Neben der Rolle als Energiespeicher wird D-Arabinitol auch als Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die in Abwehrreaktionen der Pflanze freigesetzt werden, diskutiert. Eine gleichartige Funktion in der Pilz-Pflanze-Interaktion ist für D-Mannitol beschrieben^[187-189]. Der Zuckeralkohol könnte somit dem Schutz des Pilzorganismus gegen pflanzliche Verteidigungsmechanismen dienen.

Um die strukturelle Herkunft der beobachteten Zucker und Zuckeralkohole und ihre Rolle innerhalb des Pflanze-Pilz-Systems aufzuklären, sind jedoch weiterführende Experimente nötig. Unter Einsatz der hier entwickelten Oberflächenanalytik aus Imaging FT-IR und Imaging MALDI-MS konnte aber erstmals die Verteilung der Epikutikularwachse auf der Blattoberfläche des Kirschlorbeers nach Befall mit *Trochila laurocerasi* untersucht werden. Darüber hinaus konnte das Auftreten neuer Substanzen auf der Blattoberfläche als Folge der Pilzinfektion beobachtet und diese Strukturen als Zucker und Zuckeralkohole identifiziert werden.

4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer kombinierten Oberflächenanalytik aus Imaging Transmissions-FT-IR-Spektroskopie und Imaging MALDI-TOF-MS zur Untersuchung pflanzlicher Blattoberflächen.

Entwicklung des Probenträgers und der Probennahme

Für den Einsatz in der Transmissions-FT-IR-Spektroskopie und der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde zunächst ein geeigneter Probenträger entwickelt, der den instrumentellen Anforderungen beider Analysemethoden entsprach. Das Material des Probenträgers musste für die Applikation von Positionsmarkierungen geeignet sein. Es sollte inert gegenüber Lösungsmitteln und nach Reinigung wiederverwendbar sein.

Der entwickelte Probenträger besteht aus einem Zinksulfid-Fenster in einem Edelstahlrahmen. Das zentral angeordnete ZnS-Fenster ist für IR-Strahlung transparent und somit für die Transmissions-FT-IR geeignet. Es wurde über photolithographische Bearbeitung mit einem Raster versehen, das die Positionsbestimmung in den Imaging-Experimenten ermöglichte. Da ZnS unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln ist, konnten die entwickelten Probenträger gereinigt und wiederverwendet werden. Für eine bessere Handhabung und den Einsatz im MALDI-TOF-Instrument wurde das ZnS-Fenster in einen magnetisierbaren Edelstahlrahmen eingesetzt, der den Dimensionen kommerzieller Probentargets entsprach.

Für die Untersuchung der Kutikularlipide musste ein Verfahren zur Gewinnung der epikutikularen Wachse unter Bewahrung ihrer Oberflächenverteilung und -struktur entwickelt werden. Basierend auf der *kryo-adhesiven* Extraktion nach Ensikat *et al.*^[92] konnten durch Verwendung von Wasser als Transfermedium und anschließendem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff die Wachse nach Abziehen des Blattmaterials als Oberflächenabdruck erhalten werden.

Der Strukturertalt und die Vollständigkeit des Entwachsens wurden mit verschiedenen mikroskopischen Methoden überprüft. Diese *kryo*-Extraktionsmethode ermöglichte die Isolation der die zelluläre Matrix als Schicht bedeckenden Wachse ebenso wie auch einzelner Kristalloide. Sowohl übergeordnete Wachsenordnungen, beispielsweise auf den Blattadern, als auch kleiner dimensionierte Strukturen, wie die Anordnung um Stomata, blieben erhalten. Die Trennung der Blattwachse vom Blattmaterial ermöglichte die Analyse über FT-IR ohne weitere Vorbehandlung und der Zustand der Blattoberfläche konnte so dauerhaft konserviert werden.

Optimierung der Imaging FT-IR-Spektroskopie und Imaging MALDI-TOF-MS

Der Einsatz des neu entwickelten Probenträgers für die Analyse epikutikularer Blattoberflächen wurde zunächst an entsprechenden Referenzsubstanzen erprobt. Der Vorteil von Transmissionsmessungen der Wachsabdrücke gegenüber der Reflexionsmessung direkt am Blattmaterial zeigte sich bei der Auswertung schwacher Absorptionen. Das Detektionslimit für den Transmissionsmodus war um mindestens das Zehnfache niedriger als für den Reflexionsmodus. Ein äquimolares Gemisch aus n-Hexacosanol, Hexacosansäure, Tetracosan und Eicosansäureeicosylester im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 1 μ M wurde für die Bestimmung charakteristischer Absorptionen eingesetzt. Die CH_3/CH_2 -Streckschwingungen im Bereich von 2829-2975 cm^{-1} zeigten für alle betrachteten Substanzklassen die intensivsten Banden. Sie wurde nach entsprechender Kalibration zur quantitativen Darstellung der Wachsverteilung in den später folgenden Untersuchungen der Kirschlorbeerwachse eingesetzt.

Unter Verwendung des Referenzgemisches wurde die Einsatzmöglichkeit des entwickelten Probenträgers in der Imaging MALDI-TOF-MS getestet und ein geeignetes Matrixsystem sowie die Ionisierbarkeit der Modellsubstanzen untersucht. Das ZnS-Substrat zeigte sich als beständig gegenüber dem Laserbeschuss im MALDI-TOF-Gerät und für alle betrachteten Substanzklassen konnten die entsprechenden Matrixaddukte beobachtet werden.

Im Test verschiedener Matrixsysteme wurde ^7Li -2,5-dihydroxybenzoat als geeignete Matrix für die MALDI-TOF-Analyse der unpolaren Wachse bestimmt und zeigte auch für Kohlenwasserstoffe bei einer Laserenergie von 154 μJ eine ausreichende Ionenausbeute. Mit höherer Funktionalität, d.h. mit steigender Anzahl an Sauerstoffatomen im Molekül sowie mit wachsender Kohlenstoffkette wurde eine höhere Ionisierbarkeit des Analyten beobachtet. Ester zeigten schon bei einer verminderten Laserenergie (80 %, 126 μJ) intensive Adduktionen, wohingegen Kohlenwasserstoffe die geringste Ionisierbarkeit und ein rund zehnfach höheres Detektionslimit aufwiesen.

In dem betrachteten Konzentrationsbereich konnte für alle Referenzsubstanzen gute Linearität zwischen aufgetragener Analytmenge und Signalintensität beobachtet werden. Als Detektionslimit (LOD) wurden für Tetracosan 4,3 $\mu\text{g cm}^{-2}$, für Hexacosanol und Hexacosansäure 0,5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ sowie für den Eicosansäure-eicosylester 0,7 $\mu\text{g cm}^{-2}$ bestimmt. Damit liegen die LOD für das Referenzsystem im Bereich der natürlichen Oberflächenbedeckung des Kirschlorbeers. Die hinreichende Löslichkeit der eingesetzten $^7\text{LiDHB}$ -Matrix in polaren, leicht flüchtigen Lösungsmitteln ermöglichte eine homogene Applikation auf dem Probenträger durch Aufsprühen mit einer kommerziellen Airbrush-Pistole. Die hier entwickelte MALDI-TOF-MS-Methode konnte somit für die Analyse epikutikularer Blattoberflächen angewendet werden.

Identifikation langkettiger Ester im Epikutikularwachs des Kirschlorbeers

Die qualitative und quantitative Analyse der epikutikularen Blattwachse des Kirschlorbeers mittels konventioneller GC-MS-Analytik zeigte ein von langkettigen Kohlenwasserstoffen dominiertes Wachssystem. In Übereinstimmung mit Literaturangaben wurden primäre Alkohole und Fettsäuren als Nebenkomponenten, Alkylacetate und Aldehyde als Spuren identifiziert. Die Analyse der epikutikularen Wachse über FT-IR-Spektroskopie und MALDI-TOF-MS zeigte zusätzlich das Vorhandensein langkettiger Carbonylverbindungen mit Molekülmassen im Bereich von 700 bis 900 Da, die mit der bislang bekannten Wachszusammensetzung nicht erklärbar waren.

Über Hydrid-Reduktion (LiAlH_4) und Isotopenmarkierung (LiAlD_4) der Reaktionsprodukte konnten diese unbekannt Verbindungen als Ester aus primären Alkoholen ($\text{C}_{24}\text{-C}_{30}$) und Fettsäuren ($\text{C}_{16}\text{-C}_{26}$) identifiziert werden. Die quantitative Auswertung ergab einen prozentualen Anteil der Ester am Gesamtwachs von 7,8 %. Die Oberflächenbedeckung wurde auf $3,22 \mu\text{g cm}^{-2}$ bestimmt, was rund einem Viertel der gesamten Wachsbedeckung entsprach.

Blattadern der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers zeigten eine bis zu dreifach höhere Wachsbeladung gegenüber der Lamina

Die Verteilung der epikutikularen Wachse auf der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers wurde über kombinierte Imaging FT-IR-Spektroskopie und Imaging MALDI-TOF-MS untersucht. Dafür wurde über *kryo-adhesive* Oberflächenextraktion ein Wachsabdruck der Lamina mit Blattadern auf den ZnS-Träger übertragen. Die quantitative Auswertung der CH_3/CH_2 -Absorptionen mittels Imaging FT-IR ergab eine zwei- bis dreifach höhere Wachsbeladung der Blattadern ($30\text{-}40 \mu\text{g cm}^{-2}$) gegenüber der Wachsbedeckung auf dem Intercostalgewebe ($10\text{-}25 \mu\text{g cm}^{-2}$).

Die Analyse individueller Substanzklassen zeigte ebenfalls eine Anreicherung dieser Verbindungen auf den Leitbündeln. Die Auswertung über Imaging MALDI-TOF-MS bestätigte diese strukturabhängige Substanzbeladung für Verbindungsklassen wie auch für einzelne Substanzen. Innerhalb des jeweiligen Blattbereiches wurde für das Wachsgemisch ebenso wie für individuelle Substanzklassen und einzelne Verbindungen eine homogene Verteilung beobachtet. Das heißt, unabhängig von der chemischen Funktionalität der einzelnen Wachse war die prozentuale Wachszusammensetzung über die Blattoberfläche konstant. Unterschiede ließen sich nur in der Wachsbeladung verschiedener Blattstrukturen beobachten.

Die verstärkte Wachsbeladung der Leitbündel könnte mit ihrer Bedeutung für die Wasserversorgung der Pflanze und als Transportnetz für Nähr- und Speicherstoffe zusammenhängen.

Die Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Ester über die Analyse adaxialer Wachsabdrücke zeigte ebenfalls eine homogene Verteilung im Verlauf der Blatentwicklung. Die Ester wurden erst ab dem 23. Tag nach Knospensprung beobachtet und zeigten einen den Alkanen ähnlichen Entwicklungsverlauf. Sie reicherten sich ebenfalls erst in einem späteren Entwicklungsstadium auf der Blattoberfläche an, was möglicherweise in dem höheren biosynthetischen Aufwand gegenüber Fettsäuren oder Alkoholen begründet ist.

Nach mechanischer Verwundung erfolgte keine Änderung des bestehenden Wachssystems sondern Neubildung eines Wundverschlusses

Die Untersuchung der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers nach einmaliger mechanischer Verwundung zeigte keine An- oder Abreicherung des Wachsgemisches um das geschädigte Gewebe im Verlauf der Wundheilung (1 h bis 42 d nach Behandlung). 72 h nach der Verwundung konnte aber eine Akkumulation von Alkoholen und Fettsäuren um die Wundstellen beobachtet werden, die 42 Tage nach der Behandlung wieder verschwunden war.

Das zeitlich parallele Auftreten der Alkohol- und Fettsäureanreicherungen mit der Suberinbildung lässt eher auf eine Verbindung zur Biosynthese des Wundverschlusses schließen, als auf eine verstärkte Ausbildung individueller Wachssubstanzen. Fettsäuren und primäre Alkohole treten als Endgruppen im Polymergerüst des Suberins auf und könnten im Verlauf des Suberinaufbaus auf der Blattoberfläche angereichert werden.

Zucker und Alditole traten als Metabolite in der Pilz-Pflanze-Interaktion auf

Die „Schrotschußkrankheit“ ist eine durch den Pilz *Trochila laurocerasi* hervorgerufene Pilzinfektion, die zu kreisrunden Nekrosen auf der Blattoberfläche der Wirtspflanze führt. Bei der quantitativen Analyse der epikutikularen Oberfläche um solche Nekrosen mittels Imaging FT-IR war ein Anstieg der Oberflächenbedeckung um die Wundstelle herum auf 40-50 $\mu\text{g cm}^{-2}$ zu beobachten.

Das entsprach etwa dem Zweifachen der Oberflächenbedeckung der ungeschädigten Lamina von 15-25 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Die Ergebnisse der kombinierten Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF MS zeigten das Auftreten und die Anreicherung von Hexosen und Pentosen sowie von ihnen abgeleiteten Zuckeralkoholen um das geschädigte Gewebe. Durch Extraktion und GC-MS-Analyse nekrotischer Blattoberflächen konnten Glucose, Fructose, Arabinose, Sorbitol, Inositol und Arabinitol identifiziert werden.

Da Zucker und Zuckeralkohole keine Bestandteile der gesunden, unbeschädigten Kutikula waren, musste das Auftreten dieser polaren Verbindungen auf der Blattoberfläche des Kirschlorbeers eine Folge des Pilzbefalls mit *Trochila laurocerasi* sein. Dabei könnten Glucose, Fructose und Arabinose durch die Zerstörung bzw. beim Abbau des Pflanzenmaterials durch Pilzenzyme wie Cutinasen und Cellulasen freigesetzt werden. Sie könnten ebenso in Folge pflanzlicher Abwehrreaktionen (Glucose als Amygdalin-Baustein, Inositolpolyphosphate in der Jasmonsäureregulierung) auftreten oder aus Verteidigungsmechanismen des Pilzorganismus (Arabinitol als Radikalfänger pflanzlicher ROS) herrühren.

Die hier entwickelte Oberflächenanalytik aus Imaging Transmissions-FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS ermöglichte erstmals die Untersuchung qualitativer und quantitativer Unterschiede in der Verteilung von (Wachs-)Substanzen auf der Blattoberfläche. Neben der Bestimmung bekannter Verbindungen konnten auch unbekannte Strukturen durch die Kombination von Schwingungsspektroskopie und Massenspektrometrie lokalisiert und identifiziert werden.

Für die eindeutige Strukturaufklärung unbekannter Substanzen war unter den hier beschriebenen Bedingungen der Einsatz konventioneller Analysemethoden (GC-MS) notwendig.

Durch Einsatz einer MALDI-TOF-MS-MS könnten durch charakteristische Fragmentierungsmuster der Matrixadduktionen weitere strukturspezifische Informationen erhalten werden und somit die GC-MS-Analyse in den hier beschriebenen Experimenten ersetzt werden.

Neben der IR-Spektroskopie ermöglichen die Transmissionseigenschaften des ZnS-Trägers auch die Untersuchung mit weiteren spektroskopischen Methoden wie der UV-VIS- und der Raman-Spektroskopie. Beide liefern im Falle von Analyten mit elektronenreichen Bindungen (ungesättigte Verbindungen, Aromaten) oder schweren Heteroatomen mit freien Elektronenpaaren (Halogene, Schwefel) zusätzliche Strukturinformationen und ermöglichen die isolierte Betrachtung dieser Verbindungen, die im IR-Spektrum möglicherweise keine individuellen charakteristischen Absorptionen zeigen.

Zukünftige Weiterentwicklungen wie die Kopplung mit Raman- und UV-VIS-Spektroskopie, die Entwicklung selektiver Matrixsysteme für die MALDI-TOF-MS sowie die MS-MS-Kopplung zur Analyse spezifischer Fragmentierungsmuster werden die Genauigkeit quantitativer Bestimmungen und das Einsatzspektrum dieser Oberflächenanalytik weiter vergrößern.

5 Experimenteller Teil

5.1 Kultivierung der Versuchspflanzen

Kirschlorbeerpflanzen (*Prunus laurocerasus* Caucasica) von ca. 1 m Wuchshöhe wurden im Klee Garten Center und Hornbach Baumarkt Jena erworben.

Die Pflanzen wurden zwischen 2005 und 2008 von Mai bis Oktober auf dem Terrassengelände des Institutes und von November bis April im Flurbereich des Gebäudes kultiviert. Durch Vermeidung der Frostphase erfolgte über das gesamte Kalenderjahr hinweg eine annähernd konstante Sprossen- und Blattentwicklung.

Außer für die Alterungsbestimmung der Blattwachse wurden ausschließlich voll entwickelte Blätter ab einem Alter von 100 Tagen nach dem Knospensprung verwendet, um altersbedingte Schwankungen in der Wachszusammensetzung zu minimieren.

5.2 Instrumente

5.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Blattproben für die Rasterelektronenmikroskopie wurden mit doppelseitigem Klebeband (Scotch 3M, Frankreich) auf Aluminiumträgern fixiert und im Exsikkator über Phosphorpentoxid (P_2O_5) getrocknet. *Kryo-adhesiv* gewonnene Wachsabdrücke auf Edelstahl-Plättchen bzw. dem ZnS-Substrat wurden ebenfalls im Exsikkator getrocknet.

Die Proben wurden mit 20-40 nm Gold besputtert (60 mA, 70 s, SCD 005, BAL-TEC, Liechtenstein) und die mikroskopischen Aufnahmen an einem Scanning Electron Microscope LEO-1450 VP (15 kV, 12 mm, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) angefertigt.

5.2.2 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Axioskop (Zeiss, Deutschland), ausgestattet mit einem digitalen Bildsystem (Spot, Visitron Systems, Deutschland) und unter Verwendung eines 20fach-Objektivs angefertigt.

5.2.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance DRX 500 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) bei 298 K aufgenommen.

Chemische Verschiebungen δ sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten J in Hz. Die Lösungsmittel-Signale wurden zur internen Kalibration herangezogen und betragen wie folgt: ^1H -NMR: CDCl_3 $\delta = 7,26$ ppm; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ $\delta = 2,09$ ppm; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ $\delta = 2,54$ ppm; ^{13}C -NMR: CDCl_3 $\delta = 77,16$ ppm; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ $\delta = 30,60$ ppm; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ $\delta = 40,45$ ppm.

5.2.4 Elementaranalyse (CHN-Analyse)

Elementaranalysen wurden an einem LECO CHNS/932 Analysator am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

5.2.5 GC-MS und GC-FID

Folgende GC-MS- bzw. GC-FID-Systeme wurden verwendet:

I) GC: Thermoquest Trace GC 2000 Series (Trägergas He, Fluss $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, Splitinjektion: Verhältnis 20:1, Volumen $1 \mu\text{l}$, Injektortemperatur $250 \text{ }^\circ\text{C}$),

MS: Thermoquest Trace MS 2000 Series (EI, 70 eV),

II) GC: Agilent HP 6890A GC (Optic 3 Injektor ATAS, Trägergas He, Fluss 1 ml min^{-1} , Splitinjektion: Verhältnis 10:1, Volumen $1 \mu\text{l}$, Injektortemperatur $250 \text{ }^\circ\text{C}$),

MS: TOF-MS Micromass GCT (EI, 70 eV),

III) GC: Agilent HP 6890A GC (Optic 3 Injektor ATAS, He-Fluss 1 ml min⁻¹, Splitinjektion: Verhältnis 10:1, Volumen 1 µl, Injektortemperatur 250 °C), FID-Detektor (FID-Temperatur 350 °C).

Folgende Temperaturprogramme wurden für die gaschromatographische Trennung verwendet:

Programm	Starttemperatur [°C]	Endtemperatur [°C]	Temperaturgradient [°C min ⁻¹]	Haltedauer [min]
AF_1 ↓	40	40	0	2
	40	230	40	0
	230	300	4	10
AF_2 ↓	70	70	0	2
	70	200	40	0
	200	320	4	5
AF_3 ↓	70	70	0	2
	70	170	40	0
	170	210	2	3
	210	300	40	3

Tab. 10: Daten der verwendeten Temperaturprogramme für die GC-MS und GC-FID.

Folgende GC-Säulen wurden verwendet:

ZB-1ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm, Zebron, Phenomenex)

ZB-5ms (15 m x 0,25 mm, 0,25 µm, Zebron, Phenomenex)

Die Daten der jeweils eingesetzten GC-Säule sowie die Angaben zum verwendeten GC-MS-System und Heizprogramm sind den entsprechenden Versuchsbeschreibungen direkt zu entnehmen.

Vor GC-MS- und GC-FID-Messungen wurden die Proben silyliert, um alle freien Hydroxyl- und Carboxylgruppen in die entsprechenden Trimethylsilylderivate zu überführen. Hierfür wurden die Proben in Pyridin gelöst, mit einem Überschuss an *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamide (BSTFA) versetzt und anschließend 30 min bei 70 °C erhitzt (Die eingesetzten Volumina sind den jeweiligen Versuchsbeschreibungen direkt zu entnehmen.).

Die Substanzen wurden über ihre Retentionszeiten und Massenspektren im Vergleich mit Referenzsubstanzen und Vergleichsspektren aus der NIST- und Wiley-Spektrenbibliothek identifiziert.

Für die Korrektur der Peakflächendaten der FID-Messungen wurden die in der Literatur beschriebenen Responsefaktoren^[149] verwendet. Die entsprechenden Korrekturfaktoren (KF) wurden über Division des jeweiligen Responsefaktors (RF) durch die Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül ($\sum C$ -Atome) für jede Substanz individuell berechnet (siehe Anhang):

Korrekturfaktor (KF) = Responsefaktor (RF) / $\sum C$ -Atome.

5.2.6 Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Hochauflösende Massenspektren (HR-MS) wurden per Direktinjektion bzw. über einen GC AgilentHP 6890 (Trägergas He, Fluss 1 ml min⁻¹, Splitinjektion: Verhältnis 10:1, Volumen 1 µl, Injektortemperatur 220 C°) gekoppelt mit einem Micromass MassSpec MS002 Massenspektrometer (EI, 70 eV) aufgenommen. Als GC-Säule wurde eine ZB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm, Zebron, Phenomenex) und zur chromatographischen Trennung das Temperaturprogramm AF_2 verwendet.

5.2.7 FT-IR-Spektroskopie und Imaging FT-IR

FT-IR-Transmissionsspektren wurden an einem FT-IR-Mikroskop (IR Scope 2 A 690/X-R, Brukeroptics, Ettlingen, Deutschland), ausgestattet mit einer Siliziumcarbid-Quelle (7000-400 cm⁻¹, W547/3) und einem Flüssigstickstoffgekühlten Hg-CdTe-Detektor (MCT), aufgenommen. Die Spektren umfassten einen Wellenzahlenbereich von 4000-600 cm⁻¹ und bei einer spektralen Auflösung von 4 cm⁻¹ wurden jeweils 32 Scans pro Spektrum akkumuliert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Spektren vor der Auswertung zur Minimierung CO₂- und Wasser-bedingter Hintergrundsignale der softwareeigenen „Atmosphärischen Kompensation“ unterzogen, basislinienkorrigiert und normiert.

Oberflächenscans wurden in horizontaler Probenposition unter Verwendung eines x,y-Kreuztisches mit einer Positionsgenauigkeit von 1 μm angefertigt. Als Bezugspunkt zur Positionsbestimmung und späteren Wiederfindung bestimmter Oberflächenpositionen wurde das trägereigene Koordinatensystem verwendet.

Die räumliche Auflösung der Oberflächenmessungen war durch die Größe des Detektorfensters auf einen quadratischen Bereich von 75 x 75 μm festgelegt. Im Abstand von 75 μm wurde je ein Spektrum, bestehend aus 32 Scans im Bereich von 4000-600 cm^{-1} und einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} , aufgenommen.

Zweidimensionale Oberflächenmaps wurden mittels des Bruker OPUS 5.5 Software-Paketes über den gewünschten Wellenzahlenbereich generiert. Für die Integration und die quantitative Auswertung wurden zuvor alle Transmissionspektren in Absorptionsspektren überführt, der „Atmosphärische Kompensation“ unterzogen und basislinienkorrigiert. Für die Integration der Banden wurde die Integrationsmethode B der OPUS 5.5 Software verwendet. Die Kalibration für die Quantifizierung der CH_3/CH_2 -Schwingungen wurde unter Verwendung von Referenzspektren und ebenfalls mit der Integrationsmethode B durchgeführt.

5.2.8 MALDI-TOF-MS und Imaging MALDI-TOF-MS

Vor der Aufnahme der Massenspektren wurde auf die entsprechende Probe das Silberkolloid (unverdünnt, 20 ppm, Teilchengröße 0,65 nm, Purest Colloids, USA) bzw. eine $^7\text{LiDHB}$ -Lösung (10 mg ml^{-1} in Methanol:Aceton 1:9) aufgetragen. Für eine Probenfläche von 9 mm^2 wurden in fünf wiederholten Sprühvorgängen jeweils 40 μl der entsprechenden Lösung mittels einer kommerziellen Airbrush-Pistole (Grafo T1, airbrush4you.de, Schweinfurt, Deutschland) unter Verwendung von Argon als Trägergas aus ca. 10 cm Distanz aufgesprüht.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem MALDI micro MXTM Massenspektrometer (Waters Micromass, Manchester, UK) im Reflexionsmodus und positiver Polarität aufgenommen. Das Gerät war mit einem Stickstoff-UV-Laser (337 nm, 4 ns Laserpulsdauer) ausgestattet und arbeitete mit Spannungen von 5 kV auf dem Probenziel, 12 kV am Extraktionsgitter, einer Pulsspannung von 2,2 kV und einer Detektorspannung von 2,35 kV. Mit einer Laserfrequenz von 20 Hz wurden 30 Scans pro Spektrum akkumuliert.

Die Laserenergie betrug für Messungen mit der DHB 126 μJ , mit dem Ag-Kolloid 140 μJ und mit dem $^7\text{LiDHB}$ 154 μJ .

Jeder Probenträger wies herstellungsbedingt leichte Variationen in seiner Höhe auf, was sich auf die Genauigkeit der Massendetektion auswirkte. Deshalb wurde vor jeder Messung die effektive Länge (Reflectron Field Length), d.h. die Weglänge, die die Ionen vom Probenträger bis zum Extraktionsgitter zurücklegen, über die Messung eines Standards bekannter Masse (Eicosansäureeicosylester mit $^7\text{LiDHB}$ -Matrix) ermittelt.

Mittels einer Standardlösung aus Polyethylenglykol (PEG) der mittleren molaren Massen 200, 600 und 1000 wurde das Gerät vor Beginn jeder Messung auf einen Massenbereich von 100 bis 1500 Da kalibriert. Dazu wurden eine frisch hergestellte Lösung (Aceton, 1 ml) aus PEG 200 (2,0 mg), PEG 600 (6,0 mg) und PEG 1000 (10,0 mg) mit einer ebenfalls frisch hergestellten Lösung aus DHB (10 mg, Aceton, 1 ml) als Matrix verwendet. Das PEG und die Matrix wurden in einem Volumenverhältnis von 1:2 gemischt und 2 μl des Gemisches auf den Probenträger appliziert.

Für die Aufnahme von Imaging MALDI-TOF-Massenspektren wurden die entsprechenden x,y -Positionen mittels der systemeigenen Software MassLynx v4.0 und des auf dem Träger applizierten Koordinatensystems bestimmt. Unter kontinuierlichem Abfahren der Probenfläche wurde in Schrittgrößen von 100 μm je ein Massenspektrum der Probe aufgenommen (identische instrumentelle Parameter wie für die Einzelmessungen). Die spektralen Daten wurden mittels MassLynx v4.0 integriert und unter Verwendung des MALDI Image Converters und der Image-J-Software in zweidimensionale, massenspezifische Oberflächenbilder überführt. Die Auflösung dieser Oberflächenmaps betrug bei der hier eingesetzten Schrittgröße des Lasers 10.000 Pixel pro cm^2 .

5.3 Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel waren mindestens vom Qualitätsgrad p.a. und wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) oder VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 M (Korngrößen 0,04-0,063 mm, Macherey Nagel) verwendet. Alle eingesetzten Chemikalien wurden von den in Tabelle 11 jeweils aufgeführten Herstellern bezogen.

Substanz	Hersteller/ Lieferant
Tetracosan, n-Hexadecanol, 1,16-Hexadecandiol, Nonadecansäure, D-(-)-Fructose, D-(+)-Arabinose, D-Sorbitol, LiAlD ₄ , Na ₂ CO ₃ , PEG 200, PEG 600, PEG 1000, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Squalen, Diisobutylolithiumaluminiumhydrid (DIBAL), ⁷ Lithiumhydroxid-Monohydrat, Kaliumperoxomonosulfat, Phosphorpentoxid	Sigma Aldrich, Dtl.
D-(+)-Xylose, D-(+)-Mannose, D-(+)-Glucose	Roth, Dtl.
n-Octadecanol, n-Eicosanol, n-Docosanol, n-Triacontanol, Hexadecansäure, 16-Hydroxyhexadecansäure, Hexadecandisäure, Heptadecansäure, Eicosansäure, Docosansäure, Tricosansäure, Tetracosansäure, Hexacosansäure, Octacosansäure, Triacontansäure, Octacosansäuremethylester, Acetylchlorid, Nonacosansäuremethylester, Essigsäure, N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA), Pyridin, Natriumsulfat, Kalium-/Natriumtartrat Tetrahydrat	Fluka, Dtl.
D-(+)-Arabinitol, 2-Iodbenzoesäure, LiAlH ₄	Alfa Aesar, Dtl.
n-Heptadecanol, n-Tricosanol, D-(-)-Ribose, D-(+)-Talose, Adonitol, Inositol	Acros Organics, Belgien
n-Tetracosanol, n-Hexacosanol, Eicosansäurestearylester, Eicosansäureeicosylester, 20-Hydroxyeicosansäure, 22-Hydroxydocosansäure	Campro Scientific, Dtl.
Nonacosansäure	Larodan, Schweden
Eicosan	Supelco, USA
Silberkolloid „Mesosilver“ (aq. Lösung, 20 ppm, 0,65 nm)	Purest Colloids, USA
Methanol-d ₄ , Chloroform-d ₃ , DMSO-d ₆ , Aceton-d ₆	Deutero-GmbH, Dtl.

Tab. 11: Auflistung der verwendeten Chemikalien und entsprechenden Lieferanten.

5.4 Proben­träger für die Imaging FT-IR und MALDI-TOF-MS

Der für die kombinierte Imaging FT-IR- und Imaging MALDI-TOF-MS-Analytik entwickelte Proben­träger bestand aus einem Zinksulfid-Fenster (ZnS, Durchmesser 20 mm, Crystal GmbH, Deutschland). Auf die probenabgewandte Unterseite des ZnS-Fensters wurde mittels eines nass-chemischen Ätzverfahrens (Institut für Photonische Technologien, Jena, Deutschland) ein Raster der Kantenlänge 1,0 mm aufgebracht [Abb. 45A]. Für den Einsatz des Proben­trägers in dem MALDI-TOF-MS-Gerät wurde dieser in einen magnetisierbaren Edelstahlrahmen eingebettet (CBV-Blechbearbeitung GmbH, Laasdorf, Deutschland).

Ausgehend vom Trägermittelpunkt wurden Positionsmarkierungen auf das ZnS-Substrat geätzt und auf den Stahlrahmen gelasert (Institut für Werkstoffprüfung und Fügetechnik, Jena, Deutschland). Diese Positionslinien dienten beim Einsetzen zur exakten Ausrichtung des ZnS-Substrates in dem Stahlrahmen [Abb. 45B]. Das ZnS-Fenster wurde mit Epoxydkleber in der eingearbeiteten Versenkung des Rahmens fixiert.

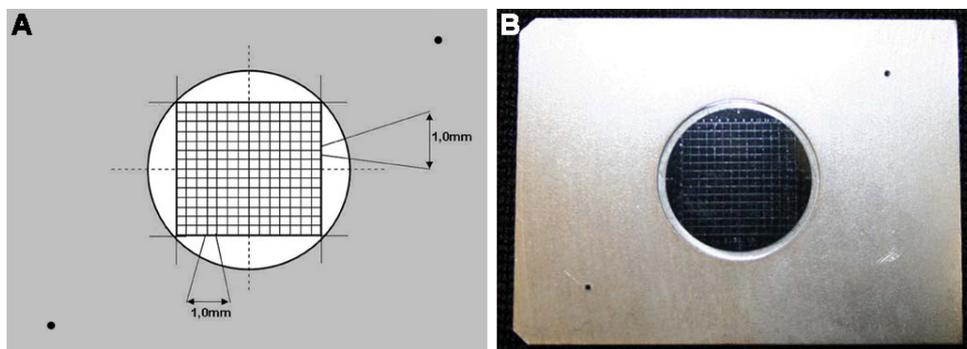


Abb. 45: A) Schematische Darstellung des entwickelten Proben­trägers mit berastertem ZnS-Fenster, B) Foto des Proben­trägers mit ZnS-Substrat in dem magnetisierbaren Stahlrahmen.

5.5 Synthesen

5.5.1 ⁷Lithium-2,5-dihydroxybenzoat (1)

Die ⁷LiDHB-Matrix wurde in Anlehnung an die Protokolle von Cvačka et al.^[143, 144] ausgehend von ⁷LiOH·H₂O und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) dargestellt. Dafür wurde die DHB (3,6 g, 23,37 mmol) in argondurchspültem Wasser (6 ml) gelöst. Unter Rühren wurde langsam eine Lösung von ⁷LiOH·H₂O (1,0 g, 23,79 mmol) in Wasser (3,0 ml) gelöst, zugetropft, bis ein schwach basischer pH-Wert erreicht wurde. Die klare, leicht bräunliche Lösung wurde zum Kristallisieren über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die ausgefallenen, farblosen Kristalle wurden abfiltriert und nach Trocknen im Vakuum aus Aceton umkristallisiert.

⁷LiDHB (1): Ausbeute 3,03 g (18,93 mmol; 81 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3217 (OH), 1691 (C=O). **¹H-NMR** (500 MHz, (CD₃)₂CO) δ [ppm]: 4,69 (s; 2H); 6,67 (d; $J_1=8,82$ Hz; 1H); 6,82 (dd; $J_1=8,82$ Hz; $J_2=3,16$ Hz; 1H); 7,15 (d; $J_2=3,15$ Hz; 1H). **¹³C-NMR** (125 MHz, (CD₃)₂CO) δ [ppm]: 116,66; 117,84; 119,22; 122,14; 148,38; 154,07; 176,81. **CHN-Analyse** (theor./gefunden) [%]: C 53,99/54,07; H 4,26/4,85.

5.5.2 Alkylacetate (C₂₀ (2), C₂₄ (3), C₂₆ (4), C₂₈ (5), C₃₀ (6))

Die in der GC-MS-Analyse der Blattwachse verwendeten Alkylacetat-Referenzen wurden aus den entsprechenden Alkoholen unter Veresterung mit Acetylchlorid in Essigsäure hergestellt. Dazu wurde jeweils der entsprechend primäre Alkohol (10 mg; n-Eicosanol 34 μ mol, n-Tetracosanol 28 μ mol, n-Hexacosanol 26 μ mol, n-Octacosanol 24 μ mol, n-Triacontanol 23 μ mol) in trockenem Dichlormethan (0,6 ml) vorgelegt, Essigsäure (1 ml) zugegeben und langsam unter Rühren Acetylchlorid (0,8 ml) zugetropft. Nach Beenden der Gasentwicklung wurde für 13 h auf 60 °C erwärmt. Die Lösungen wurden unter einem Argonstrom eingengt und der Rückstand in Dichlormethan (10 ml) aufgenommen, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase noch zweimal mit Dichlormethan (10 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtrieren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Eicosylacetat (2): Ausbeute 9,47 mg (28 μmol ; 83 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2957; 2918; 2849; 1743, 1464; 1367; 1260; 1028; 800; 730; 720. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 0,88 (t; $J=6,79$ Hz; 3H); 1,25 (m; 34H); 1,58-1,64 (m; 2H); 2,04 (s; 3H); 4,03-4,06 (t; $J=6,84$ Hz; 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 14,11; 21,02; 22,69; 25,90; 28,56; 29,26; 29,36; 29,52; 29,57; 29,66; 29,69 (9C); 31,92; 64,67; 171,25. **EI-MS** (70 eV) m/z (%): 280 (5); 252 (7); 153 (7); 139 (15); 125 (30); 111 (65); 97 (100); 83 (94); 69 (72); 61 (64); 57 (74). **HR-MS** $[\text{M}]^+$: ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$: 340,334131; gef.: 340,333311.

Tetracosylacetat (3): Ausbeute 8,84 mg (22 μmol ; 79 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2956; 2917; 2849; 1742, 1464; 1367; 1235; 1037; 893; 800; 730; 720. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 0,88 (t; $J=6,79$ Hz; 3H); 1,25 (m; 42H); 1,61 (m; 2H); 2,04 (s; 3H); 4,05 (t; $J=6,79$ Hz; 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 14,11; 21,02; 22,69; 25,91; 28,60; 29,26; 29,36; 29,52; 29,57; 29,69 (14C); 31,92; 64,67; 171,25. **EI-MS** (70 eV) m/z (%): 336 (5); 308 (5); 153 (9); 139 (15); 125 (33); 111 (63); 97 (100); 83 (83); 69 (69); 61 (51); 57 (77). **HR-MS** $[\text{M}]^+$: ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$: 396,396731; gef.: 396,396312.

Hexacosylacetat (4): Ausbeute 9,43 mg (22 μmol ; 85 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2956; 2917; 2849; 1743, 1465; 1367; 1239; 1045; 892; 802; 730; 720; 670; 644. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 0,88 (t; $J=6,79$ Hz; 3H); 1,25 (m; 46H); 1,61 (m; 2H); 2,04 (s; 3H); 4,05 (t; $J=6,78$ Hz; 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 14,11; 21,02; 22,69; 25,91; 28,60; 29,26; 29,36; 29,52; 29,57; 29,69 (16C); 31,92; 64,67; 171,24. **EI-MS** (70 eV) m/z (%): 364 (5); 336 (5); 153 (10); 139 (175); 125 (37); 111 (69); 97 (98); 83 (100); 69 (70); 61 (61); 57 (83). **HR-MS** $[\text{M}]^+$: ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$: 424,428032; gef.: 424,428000.

Octacosylacetat (5): Ausbeute 7,17 mg (16 μmol ; 65 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2957; 2917; 2849; 1743, 1464; 1367; 1259; 1072; 801; 730; 720; 670; 645. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 0,88 (t; $J=6,80$ Hz; 3H); 1,25 (m; 50H); 1,61 (m; 2H); 2,04 (s; 3H); 4,05 (t; $J=6,79$ Hz; 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 14,11; 21,02; 22,69; 25,91; 28,60; 29,26; 29,36; 29,52; 29,57; 29,70 (18C); 31,92; 64,67;

171,25. **EI-MS** (70 eV) m/z (%): 392 (5); 364 (5); 153 (12); 139 (15); 125 (39); 111 (77); 97 (90); 83 (100); 69 (65); 61 (61); 57 (85). **HR-MS** $[M]^+$: ber. für $C_{30}H_{60}O_2$: 452,459332; gef.: 452,459974.

Triacontanylacetat (6): Ausbeute 9,75 mg (20 μ mol; 89 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2956; 2917; 2849; 17431, 1463; 1367; 1238; 1038; 800; 729; 719; 670; 643. **1H -NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 0,88 (t; $J=6,78$ Hz; 3H); 1,25 (m; 54H); 1,61 (m; 2H); 2,04 (s; 3H); 4,05 (t; $J=6,79$ Hz; 2H). **^{13}C -NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 14,11; 21,02; 22,69; 25,91; 28,60; 29,26; 29,36; 29,52; 29,57; 29,70 (18C); 31,92; 64,67; 171,25. **EI-MS** (70 eV) m/z (%): 420 (5); 392 (3); 153 (9); 139 (16); 125 (29); 111 (55); 97 (100); 83 (82); 69 (52); 61 (54); 57 (67). **HR-MS** $[M]^+$: ber. für $C_{32}H_{64}O_2$: 480,490632; gef.: 480,490242.

5.5.3 2-Iodoxybenzoesäure (IBX, (7))

Die Darstellung des Oxidationsmittels IBX erfolgte ausgehend von 2-Iodbenzoesäure und Kaliumperoxomonosulfat nach einem Protokoll von Frigerio *et al.*^[148]. Dafür wurde das Kaliumperoxomonosulfat (18,1 g, 29,44 mmol) in Wasser (65 ml) vorgelegt und die 2-Iodbenzoesäure (5,0 g, 20,17 mmol) bei Raumtemperatur zugegeben. Anschließend wurde unter Rühren für 3 h auf 75 °C erhitzt, danach langsam auf 5 °C abgekühlt und für eine weitere Stunde unter Kühlen gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, fünfmal mit Wasser (10 ml) sowie zweimal mit Aceton (10 ml) gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

IBX (7): Ausbeute 3,8 g (13,58 mmol; 67 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3098; 2276; 2015; 1973, 1859; 1660; 1435. **1H -NMR** (500 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ [ppm]: 7,84 (dt; $J_1=7,39$ Hz; $J_2=0,76$ Hz; 1H); 8,02 (dt; $J_1=7,37$ Hz; $J_3=1,35$ Hz; 1H); 8,04 (dt; $J_4=7,82$ Hz; $J_3=1,35$ Hz; 1H); 8,14 (d; $J_4=7,84$ Hz; 1H). **^{13}C -NMR** (125 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ [ppm]: 124,92; 130,00 ; 31,35; 132,86; 133,31; 146,46; 167,39.

5.5.4 Aldehyde (C₂₂ (8), C₂₄ (9), C₂₆ (10), C₂₈ (11), C₃₀ (12))

Zur Oxidation wurde jeweils der entsprechende Alkohol (je 50 mg, 153 μmol C₂₂, 141 μmol C₂₄, 131 μmol C₂₆, 122 μmol C₂₈, 114 μmol C₃₀) in Essigsäureethylester (10 ml) gelöst, anschließend IBX im Überschuss (459 μmol für C₂₂, 423 μmol für C₂₄, 393 μmol für C₂₆, 366 μmol für C₂₈, 342 μmol für C₃₀) zugegeben und für 3 h auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde nach dem Abkühlen filtriert, das Filtrat im Vakuum eingengt und das Produkt säulenchromatographisch (Kieselgel 60 M, Diethylether:Petrolether 1:2) aufgearbeitet^[146, 147].

Docosanal (8): Ausbeute 32,30 mg (100 μmol ; 65 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2953; 2916; 2849; 1714, 1470; 1390; 717; 670; 645. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 0,88 (t; $J_1=6,98$ Hz; 3H); 1,19 (m; 36H); 1,63 (m; $J_2=14,73$ Hz; $J_3=7,32$ Hz; 2H); 2,41 (dt; $J_3=7,39$ Hz; $J_4=1,90$ Hz; 2H); 9,76 (t; $J_4=1,89$ Hz; 1H). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 14,10; 22,10; 22,69; 29,17; 29,36; 29,43; 29,58; 29,69 (12C); 31,93; 43,92; 202,89. **EI-MS** (70eV) m/z (%): 324 (2); 306 (10); 278 (7); 138 (15); 124 (21); 110 (26); 96 (79); 82 (100); 68 (50); 57 (84); 55 (56). **HR-MS** [M]⁺: ber. für C₂₂H₄₄O: 324,339130; gef.: 324,339216.

Tetracosanal (9): Ausbeute 26,35 mg (75 μmol ; 53 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2956; 2917; 2849; 1719, 1466; 1411; 1261; 1092; 1020; 800; 730; 720; 670; 644. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 0,88 (t; $J_1=6,98$ Hz; 3H); 1,25 (m; 40H); 1,63 (m; $J_2=14,73$ Hz; $J_3=7,33$ Hz; 2H); 2,41 (dt; $J_3=7,37$ Hz; $J_4=1,89$ Hz; 2H); 9,76 (t; $J_4=1,90$ Hz; 1H). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 14,10; 22,10; 22,68; 29,17; 29,35; 29,42; 29,58; 29,69 (14C); 31,92; 43,91; 202,88. **EI-MS** (70eV) m/z (%): 352 (2); 334 (12); 306 (7); 138 (15); 124 (20); 110 (26); 96 (76); 82 (100); 69 (45); 57 (86); 55 (52). **HR-MS** [M]⁺: ber. für C₂₄H₄₈O: 352,371156; gef.: 352,370517.

Hexacosanal (10): Ausbeute 35,81 mg (94 μmol ; 72 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2960; 2917; 2849; 1720, 1465; 1261; 1093; 1021; 800; 730; 720; 659. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ ppm]: 0,88 (t; $J_1=6,98$ Hz; 3H); 1,25 (m; 44H); 1,63 (m; $J_2=14,71$ Hz; $J_3=7,34$ Hz; 2H); 2,41 (dt; $J_3=7,38$ Hz; $J_4=1,90$ Hz; 2H); 9,76 (t; $J_4=1,89$ Hz;

1H). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 14,10; 22,10; 22,69; 29,17; 29,35; 29,43; 29,58; 29,70 (16C); 31,93; 43,91; 202,88. **EI-MS** (70eV) m/z (%): 380 (2); 362 (10); 334 (5); 138 (16); 124 (20); 110 (29); 96 (78); 82 (100); 69 (50); 57 (77); 55 (50). **HR-MS** [M]⁺: ber. für C₂₆H₅₂O: 380,402367; gef.: 380,401817.

Octacosanal (11): Ausbeute 38,00 mg (93 μmol; 76 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 2956; 2917; 2849; 1717, 1465; 1260; 1023; 799; 730; 720; 670; 644. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 0,88 (t; $J_1=6,98$ Hz; 3H); 1,25 (m; 48H); 1,63 (m; $J_2=14,73$ Hz; $J_3=7,34$ Hz; 2H); 2,41 (dt; $J_3=7,39$ Hz; $J_4=1,89$ Hz; 2H); 9,76 (t; $J_4=1,88$ Hz; 1H). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 14,10; 22,10; 22,69; 29,17; 29,35; 29,43; 29,58; 29,70 (18C); 31,93; 43,92; 202,88. **EI-MS** (70eV) m/z (%): 408 (3); 390 (15); 362 (5); 138 (16); 124 (21); 110 (29); 96 (87); 82 (100); 69 (50); 57 (85); 55 (53). **HR-MS** [M]⁺: ber. für C₂₈H₅₆O: 408,433207; gef.: 408,433117.

Triacontanal (12): Ausbeute 40,80 mg (94 μmol; 82 %). **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 2956; 2918; 2849; 1717, 1464; 1260; 1015; 797; 730; 719; 670; 643. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 0,88 (t; $J_1=6,98$ Hz; 3H); 1,25 (m; 52H); 1,63 (m; $J_2=14,74$ Hz; $J_3=7,34$ Hz; 2H); 2,41 (dt; $J_3=7,36$ Hz; $J_4=1,89$ Hz; 2H); 9,76 (t; $J_4=1,89$ Hz; 1H). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 14,09; 22,10; 22,69; 29,18; 29,36; 29,43; 29,58; 29,70 (20C); 31,93; 43,91; 202,85. **EI-MS** (70eV) m/z (%): 436 (3); 418 (10); 390 (4); 138 (15); 124 (20); 110 (26); 96 (90); 82 (100); 69 (49); 57 (78); 55 (47). **HR-MS** [M-18]⁺: ber. für C₃₀H₆₀O: 418,451996; gef.: 418,453852.

5.6 Versuchsanordnungen

5.6.1 *Kryo-adhesive* Extraktion der Blattwachse

Negativabdrücke der epikutikularen Blattoberfläche wurden über eine modifizierte Methode der *kryo-adhesiv*-Extraktion nach Ensikat *et al.*^[92] gewonnen.

Dafür wurde auf die zu untersuchende Probenoberfläche ein Tropfen destilliertes Wasser als Transfermedium gegeben und das Zinksulfidfenster des entwickelten Probenträgers so auf die Blattoberfläche gedrückt, dass sich keine Luftbläschen in dem Wasserfilm zwischen Blattmaterial und Probenträger befanden. Diese Anordnung wurde für rund 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und nach vollständigem Gefrieren der Wasserschicht das Blattmaterial im noch gefrorenen Zustand abgezogen. Die in der Eisschicht eingebetteten Wachse wurden nach Schmelzen und Verdunsten des Wassers als Negativabdruck auf dem Zinksulfidfenster erhalten und konnten ohne weitere Vorbehandlung in der nachfolgenden Analytik eingesetzt werden.

5.6.2 Vergleich von Reflexions-FT-IR und Transmissions-FT-IR

Für den Vergleich von Transmissions- und Reflexions-FT-IR-Spektroskopie wurden von einem *kryo-adhesiven* Wachsabdruck auf dem ZnS-Träger Spektren im Transmissionsmodus und von der unbehandelten Blattoberfläche im Reflexionsmodus aufgenommen. Die Spektren wurden zur besseren Vergleichbarkeit unter Verwendung der Software OPUS 5.5 basislinienkorrigiert.

5.6.3 Bestimmung signifikanter Schwingungen in der FT-IR

Zur Bestimmung charakteristischer Absorptionssignale und der Detektionsgrenzen wurden die Spektren von Tetracosan (CH), n-Hexacosanol (OH), Hexacosansäure (FS) und Eicosansäureeicosylester (AE) sowie einem äquimolaren Gemisch aller vier Referenzen von den in Tabelle 12 angegebenen Konzentrationen gemessen.

Dazu wurden die entsprechenden Substanzen in den angegebenen Lösungsmitteln gelöst und jeweils 1 μl der Standardlösungen mit einer Hamiltonspritze auf den ZnS-Träger so aufgetragen, dass die Probe eine Kreisfläche von rund 1 mm Durchmesser bedeckte.

c [mM]	CH [Hexan]	OH [CHCl_3]	F [CHCl_3]	AE [CHCl_3]	Referenzmix [CHCl_3]
10	+	+	+	+	-
1	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	-	+
0,2	+	+	+	-	+
0,1	+	+	+	+	+
0,05	-	-	-	+	+
0,02	-	-	-	+	+
0,01	-	+	+	+	+
0,001	-	+	+		+

Tab. 12: Übersicht über die zur Bestimmung charakteristischer Absorptionen eingesetzten Referenzen in den entsprechenden Konzentrationen und Lösungsmitteln.

Für die Quantifizierung der Blattwache anhand der CH_3/CH_2 -Absorption wurde von den Standardlösungen des Referenzgemisches in je vier individuellen Wiederholungen wie oben beschrieben 1 μl aufgetragen. Es wurden die entsprechenden FT-IR-Absorptionsspektren aufgenommen, da die verwendete Software für die Quantifizierung ausschließlich Absorptionsspektren verwenden konnte. Über das softwareeigene Quantifizierungsprogramm QUANT1 wurde die entsprechende Kalibration (Integrationsmethode B, Wellenzahlenbereich 2829-2975 cm^{-1}) durchgeführt und die erstellte QUANT-Methode für die Bestimmung der Wachsverteilung in den späteren Imaging Experimenten eingesetzt.

5.6.4 Vergleich der Matrixsysteme und Bestimmung der Detektionslimits (LODs) in der MALDI-TOF-MS

Der Einsatz des Silberkolloids und des $^7\text{LiDHB}$ als Matrix in der MALDI-TOF-MS für die Analyse epikutikularer Wachse wurde an dem äquimolaren Gemisch der vier Referenzsubstanzen getestet.

Dazu wurde wie in Kapitel 5.6.3 beschrieben 1 µl des Gemisches der Referenzsubstanzen mit der Konzentration 10 mM auf das ZnS-Substrat aufgetragen. Anschließend wurden die Proben mit dem Silberkolloid bzw. der ⁷LiDHB-Lösung besprüht und über MALDI-TOF-MS analysiert. Es wurden bei einer Laserfrequenz von 20 Hz 30 Scans pro Spektrum akkumuliert.

Die LODs von Tetracosan (CH), n-Hexacosanol (OH), Hexacosansäure (FS), Eicosansäureeicosylester (AE) und dem Gemisch aller vier Referenzen wurden für die MALDI-TOF-MS auf den ZnS-Substraten und unter Verwendung der ⁷LiDHB-Matrix bestimmt. Dazu wurden die in Tabelle 10 angegebenen Standardlösungen verwendet und die Proben wie in Kapitel 5.6.3 beschrieben, auf den ZnS-Träger aufgetragen. Im Anschluss an die FT-IR-Messungen wurden die Proben mit der ⁷LiDHB-Lösung besprüht und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Es wurden bei einer Laserfrequenz von 20 Hz und einer Laserenergie von 154 µJ 30 Scans pro Spektrum akkumuliert.

Mittels der geräteeigenen Software wurde aus den Spektren der Hintergrund subtrahiert, die Spektren wurden geglättet und zentriert. Für die Bestimmung des Detektionslimits wurde ein entsprechender Massenbereich im Spektrum gewählt, in dem keine Proben- oder Matrixsignale erschienen. Die Analytkonzentration für ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 wurde als Detektionslimit bestimmt. Je Referenzsubstanz und Konzentration wurden vier Wiederholungsmessungen von vier individuell aufgetragenen Proben durchgeführt.

5.6.5 Qualitative und quantitative Analyse der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers

Für die qualitative und quantitative Analyse der Oberflächenwachse des Kirschlorbeers wurden ausschließlich über *kryo-adhesiv*-Extraktion isolierte epikutikulare Wachse verwendet. Dafür wurden Edelstahlplättchen mit einem Durchmesser von 23 mm (CBV-Blechbearbeitung GmbH, Laasdorf, Deutschland) benutzt. Auf die vorab mit destilliertem Wasser abgespülten Blätter wurden 200 µl destilliertes Wasser als Tropfen aufgebracht und ein Metallplättchen so auf die Blattoberfläche gedrückt, dass der gesamte Zwischenraum zwischen Metall und Blatt von einem dünnen Wasserfilm bedeckt war.

Diese Probenanordnung wurde anschließend für 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und noch im gefrorenen Zustand das Blattmaterial abgezogen. Der Erfolg der Extraktion war umso höher, je ebener die verwendete Blattoberfläche war. Deshalb wurde ausschließlich die Blattlamina unter Vermeidung der Hauptblattadern verwendet.

Jeweils 30 wachseladene Plättchen wurden pro Extraktionsansatz in 50 ml Dichlormethan gesammelt und der interne Standard (n-Eicosan, 40 µl, 5 mg ml⁻¹) zugegeben. Durch 15 min Behandlung im Ultraschallbad wurde das Wachs von den Stahlscheiben gewaschen und aus der wässrigen Phase extrahiert. Der Waschvorgang wurde zweimal mit je 50 ml Dichlormethan wiederholt und die vereinten organischen Phasen nach Filtration über Kieselgel im Vakuum eingengt. Insgesamt wurden vier Extraktionsproben von je 30 Plättchen gesammelt. Der getrocknete Wachsextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -32 °C aufbewahrt.

Die Oberflächenbedeckung des Kirschlorbeers wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Oberflächenbedeckung } [\mu\text{g cm}^{-2}] = m / (n \cdot A) \quad A = \pi \cdot d^2 / 4$$

Mit m: Masse des extrahierten Wachses [µg], n: Anzahl der verwendeten Metallplättchen, A: Fläche eines Metallplättchens [cm²], d: Durchmesser eines Metallplättchens [cm], π: Kreiszahl.

Für die GC-MS- und GC-FID-Analyse wurden die Proben in Dichlormethan gelöst und auf eine Konzentration von 1 mg ml⁻¹ gebracht. Ein Aliquot von jeweils 100 µl wurde entnommen und nach Entfernen des Lösungsmittels in 50 µl Pyridin und 100 µl BSTFA 30 min bei 70 °C silyliert.

Die erste qualitative Analyse wurde unter Verwendung des GC-MS-Systems I, der ZB-5ms-Säule und des Heizprogramms AF_2 durchgeführt. Es wurden alle Ionen in einem Massenbereich von 31-651 Da detektiert.

Die anschließende quantitative Bestimmung wurde am GC-MS-System II (gekoppelt mit TOF für qualitative Zuordnung, gekoppelt mit FID für die quantitative Bestimmung der Einzelsubstanzen) unter Verwendung der ZB-1ms-Säule und des Heizprogramms AF_1 durchgeführt.

5.6.6 Analyse der Kirschchlorbeerwachse mit FT-IR und MALDI-TOF-MS

Für die Analyse der kutikularen Blattwachse des Kirschchlorbeers mittels FT-IR und MALDI-TOF wurde 1 µl des *kryo-adhesiv*-Extraktes (1 mg ml⁻¹, Dichlormethan) mit einer Hamiltonspritze auf das ZnS-Fenster des entwickelten Probenträgers aufgetragen und Transmissions-FT-IR-Spektren aufgenommen.

Anschließend wurde dieselbe Probe mit der ⁷LiDHB-Lösung beschichtet und über MALDI-TOF-MS nach Bestimmung der effektiven Länge und Kalibration untersucht.

5.6.7 Identifikation der unbekanntesten Verbindungen

Die für die Derivatisierungsreaktionen zur Aufklärung der unbekanntesten Verbindungen im Kirschchlorbeerwachs verwendeten *kryo-adhesiven* Wachsextrakte wurden wie in Kapitel 5.6.5 beschrieben, gewonnen. Für die Reduktion mit LiAlH₄ (PL5-PL8) und LiAlD₄ (PL9-PL12) wurden je 4 Proben von jeweils 30 Metallplättchen verwendet und n-Eicosan (40 µl, 5 mg ml⁻¹) als interner Standard eingesetzt.

Für die Reduktion wurden die einzelnen Wachsextrakte in trockenem THF (1,0 ml) gelöst und unter Argonatmosphäre das Reduktionsmittel (0,05 mg, LiAlH₄ für PL5-PL8, LiAlD₄ für PL9-PL12) zugegeben. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde für 13 h auf 60 °C erhitzt, anschließend mit Wasser (1 ml) das überschüssige Reduktionsmittel hydrolysiert und gesättigte Kalium-/Natriumtartratlösung (3 ml) zur Komplexbildung des entstandenen Aluminiumhydroxids zugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan (10 ml) extrahiert, die organischen Phasen mit Wasser (10 ml) neutral gewaschen und nach Trocknen über Natriumsulfat das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Für die anschließende GC-MS- und GC-FID-Analyse wurden die Proben erneut in Dichlormethan gelöst und auf eine Konzentration von 1 mg ml⁻¹ gebracht. Ein Aliquot von jeweils 100 µl wurde entnommen und nach Entfernen des Lösungsmittels in 50 µl Pyridin und 100 µl BSTFA 30 min bei 70 °C behandelt.

Die Proben wurden qualitativ und quantitativ über das GC-MS-System II (TOF und FID) unter Verwendung der ZB-1ms-Säule und des Temperaturprogramms AF_1 ausgewertet.

Für die Analyse der Reaktionsprodukte mit FT-IR und MALDI-TOF-MS wurde von den unsilylierten Lösungen in Dichlormethan je ein Aliquot von 1 µl entnommen, auf den ZnS-Träger mit einer Hamiltonspritze aufgetragen und FT-IR-Spektren im Transmissionsmodus aufgenommen. Für die anschließende MALDI-TOF-MS-Analyse wurde die Probe mit der ⁷LiDHB-Lösung besprüht und nach Bestimmung der effektiven Länge und Kalibration untersucht.

5.6.8 Analyse der Wachsverteilung auf der adaxialen Blattoberfläche

Mittels der *kryo-adhesiven* Extraktion wurde von der adaxialen Blattoberfläche eines voll entwickelten Kirschlorbeerblattes ein Oberflächenabdruck auf das ZnS-Fenster des Probenträgers übertragen. Dabei wurde ein Bereich der Lamina mit Blattspreiten (Haupt- und Nebenader) isoliert. Anschließend wurde mittels Imaging FT-IR-Spektroskopie eine Probenfläche von 3,0 x 3,0 mm untersucht.

Zur Darstellung der Verteilung relevanter Substanzklassen wurden die Absorptionen individueller funktioneller Gruppen über die in Tabelle 13 angegebenen Wellenzahlenbereiche durch Integration und Quantifizierung ausgewertet.

charakteristische Schwingung	integrierter Wellenzahlenbereich [cm ⁻¹]
v OH	3099-3500
v _{s/as} CH ₂ /CH ₃ (δ CH ₃ /CH ₂)	2829-2975 (1440-1486)
v C=O	1695-1749
v C-OH, v C-OC	1000-1200

Tab. 13: Für die Imaging FT-IR ausgewertete Wellenzahlenbereiche zur Darstellung der Oberflächenverteilung relevanter Substanzklassen.

Für die anschließende MALDI-TOF-MS wurde die ⁷LiDHB-Matrix auf die betrachtete Probenfläche aufgetragen und Massen im Bereich von 200-1000 Da aufgenommen.

Die Verteilung charakteristischer Wachssubstanzen wurde durch Darstellung der Signalintensitäten für die in Tabelle 14 aufgelisteten Verbindungen bzw. ihrer Matrixaddukte untersucht.

Dazu wurde die Verteilung jeder Substanzklasse durch Addition der Einzelintensitäten der vier Hauptvertreter dargestellt. Tabelle 14 zeigt die für die summierten Oberflächenbilder verwendeten Verbindungen und die Massen der entsprechenden Ionen.

Substanzklasse	Kohlenstoffkette	[M+ ⁷ Li] ⁺ [Da]
Alkane	C ₂₇	387,7
	C ₂₉	415,8
	C ₃₁	443,8
	C ₃₃	471,8
n-Alkohole	C ₂₄	361,6
	C ₂₆	389,6
	C ₂₈	417,7
	C ₃₀	445,7
Fettsäuren	C ₂₆	403,6
	C ₂₈	431,7
	C ₃₀	459,7
	C ₃₂	487,8
Alkylester	C ₄₆	684,1
	C ₄₈	712,2
	C ₅₀	740,2
	C ₅₂	768,3

Tab. 14: Die über Imaging MALDI-TOF-MS ausgewerteten Adduktionen und die zugrunde liegenden Substanzen.

5.6.9 Dynamische Entwicklung und Oberflächenverteilung der Ester

Zur Untersuchung der altersabhängigen Zusammensetzung und Verteilung der epikutikularen Wachse des Kirschchlorbeers wurden die adaxialen Blattoberflächen vom Knospensprung bis zur Vollentwicklung des Blattes untersucht. Jeweils 3, 8, 23, 43, 57, 70 und 100 Tage nach Knospensprung wurde ein *kryo-adhesiver* Oberflächenabdruck auf das ZnS-Substrat übertragen und mittels (Imaging) FT-IR und (Imaging) MALDI-TOF-MS untersucht.

Für jeden Zeitpunkt wurden zunächst ein FT-IR-Spektrum im Transmissionsmodus und ein MALDI-TOF-Massenspektrum im Bereich von 200-1000 Da aufgenommen, um das zeitliche Erscheinen der Esterstrukturen auf der Blattoberfläche zu untersuchen.

Ab dem 23. Tag nach Knospensprung wurden die entsprechenden Proben ebenfalls mittels Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS zur Untersuchung der Oberflächenverteilung ausgewertet.

Dafür wurden über eine Fläche von 1,5 x 1,5 mm Transmissionsspektren aufgenommen und die in Kapitel 5.6.8 angegebenen Wellenzahlenbereiche durch Integration bzw. Quantifizierung ausgewertet.

In der anschließenden Imaging MALDI-TOF-MS wurden über denselben Ausschnitt des Oberflächenabdrucks konsekutiv Massenspektren aufgenommen. Es wurden die in Kapitel 5.6.8 benannten Massen bzw. Signale zur Darstellung der Wachsverteilung ausgewertet.

5.6.10 Reaktion der Blattoberfläche auf mechanische Verwundung

Die Auswirkung mechanischer Verwundung auf die Zusammensetzung und Verteilung der epikutikularen Blattwachse des Kirschlorbeers wurde an der adaxialen Blattoberfläche nach definierter Beschädigung des Blattgewebes untersucht. In das Gewebe voll entwickelter Blätter wurden dafür mittels einer Kanüle Löcher von rund 1 mm Durchmesser gestochen, so dass das Gewebe vollständig aus dem Blatt herausgetrennt wurde. Im Abstand von 1 h, 10 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h und 42 d ab dem Zeitpunkt der Verwundung wurden von dem geschädigten Blattgewebe mittels *kryo-adhesiv*-Extraktion je ein Negativabdruck der Blattoberfläche auf einen ZnS-Träger überführt. Eine Probenfläche von 3,0 x 3,0 mm, die sowohl die Verwundungsstelle, als auch umgebendes unbeschädigtes Gewebe beinhaltete, wurde je Zeitpunkt über Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS untersucht. Zur Darstellung der Wachsverteilung wurden die in Kapitel 5.6.8 angegebenen Wellenzahlenbereiche und Ionensignale ausgewertet.

5.6.11 Reaktion der Blattoberfläche auf Pilzbefall

Die unter den oben benannten Bedingungen kultivierten Versuchspflanzen zeigten an einigen Blättern die Symptome der „Schrotschusskrankheit“, was auf einen Pilzbefall der Pflanzen schließen ließ.

Die Identifikation des krankheitsverursachenden Pathogens wurde von der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL, Erfurt) über Mikroskopie der Blattläsionen und Zuordnung der aufgefundenen Konidien durchgeführt. Der pilzliche Erreger wurde als *Trochila laurocerasi* identifiziert.

Zur Untersuchung der Auswirkung des Pathogenbefalls auf die epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers wurden die durch den Pilz verursachten Läsionen der Blattoberfläche näher betrachtet. Die Oberfläche des geschädigten Blattmaterials, welches Löcher in der Blattoberfläche umgeben von nekrotischem Gewebe zeigte, wurde mittels der *kryo-adhesiv*-Extraktion auf einen ZnS-Träger überführt. Eine Probenfläche von 3,0 x 3,0 mm wurde anschließend mit Imaging FT-IR und Imaging MALDI-TOF-MS ausgewertet.

Zur weiteren Identifikation der Zucker und Alditole wurde die Oberfläche von nekrotischem Blattgewebe *kryo-adhesiv* extrahiert und gaschromatographisch untersucht (GC-MS-System I, ZB-5ms Säule, Heizprogramm AF_3). Als Referenzverbindungen wurden die in Tabelle 15 benannten Substanzen eingesetzt.

Für die GC-MS und HR-MS wurden jeweils Standard-Lösungen (1 mM, Methanol) der Zucker- und Alditol-Referenzen hergestellt. Ein Aliquot von 100 µl wurde nach Entfernen des Lösungsmittels in 50 µl Pyridin und 100 µl BSTFA 30 min bei 70 °C behandelt und über GC-MS (System I, ZB-5ms-Säule, Heizprogramm AF_3) untersucht.

Für die IR-Analyse wurden jeweils 1 µl der D-(+)-Glucose- und der D-(+)-Arabinitol-Lösungen auf das ZnS-Substrat aufgetragen und nach dem Trocknen über Transmissions-FT-IR untersucht.

Referenz	Retentionszeit [min]	theoretische Masse	gefundene Masse
D-(+)-Arabinose	5,53/5,75/5,97	[M] ⁺ 438,210938	438,212564
D-(+)-Glucose	7,24/7,89/8,65/8,86/10,44	[M-15] ⁺ 525,237557	525,237104
D-(-)-Fructose	7,43/7,52	[M] ⁺ 540,261032	540,263016
Adonitol	6,51	[M-15] ⁺ 497,242642	497,239972
D-(+)-Arabinitol	6,49	[M-15] ⁺ 497,242642	497,239972
D-Sorbitol	9,55	[M-15] ⁺ 599,292736	599,292161
Inositol	9,89/10,32/10,71	[M-73] ⁺ 539,253207	539,255768

Tab. 15: Retentionszeiten (GC-MS-System I, ZB-5ms-Säule, Heizprogramm AF_3), theoretische und experimentell über HR-MS ermittelte Massen charakteristischer Molekül- bzw. Fragmentationen für die Zucker- und Alditolreferenzen.

Als ergänzender Nachweis wurden die exakten Massen der Kohlenhydrate und Alditole im Läsionsextrakt über hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) ermittelt.

Für die LOD-Bestimmung der D-(+)-Glucose in der MALDI-TOF-MS wurden entsprechende Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 5 µM in Methanol hergestellt und jeweils 1 µl wie unter 5.6.3 beschrieben auf das ZnS-Fenster aufgetragen. Nach Applikation des ⁷LiDHB wurden bei einer Laserfrequenz von 20 Hz und einer Laserenergie von 154 µJ 30 Scans pro Spektrum akkumuliert. Je Konzentration wurden vier Wiederholungen angefertigt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] H. Schildknecht, Plant Defense Substances .14. Irritant and Defense Substances of Higher-Plants - a Chemical Herbarium. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1981**, *20*, 164-184.
- [2] T. Eisner, M. Eisner, E.R. Hoebeke, When defense backfires: Detrimental effect of a plant's protective trichomes on an insect beneficial to the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 4410-4414.
- [3] W.M. Daniewski, M. Gumulka, W. Anczewski, M. Masnyk, E. Bloszyk, K.K. Gupta, Why the yew tree (*Taxus baccata*) is not attacked by insects. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1279-1282.
- [4] C. Nozzolillo, J.T. Arnason, F. Campos, N. Donskov, M. Jurzysta, Alfalfa leaf saponins and insect resistance. *Journal of Chemical Ecology* **1997**, *23*, 995-1002.
- [5] P.W. Pare, J.H. Tumlinson, Induced synthesis of plant volatiles. *Nature* **1997**, *385*, 30-31.
- [6] B. Schulze, C. Kost, G.I. Arimura, W. Boland, Signal reception, biosynthesis and ecology - Fragrance: The language of plants. *Chemie in Unserer Zeit* **2006**, *40*, 366-377.
- [7] I.T. Baldwin, E.A. Schmelz, Z.P. Zhang, Effects of octadecanoid metabolites and inhibitors on induced nicotine accumulation in *Nicotiana sylvestris*. *Journal of Chemical Ecology* **1996**, *22*, 61-74.
- [8] P.W. Pare, J.H. Tumlinson, Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* **1999**, *121*, 325-331.
- [9] M. Dicke, H. Dijkman, Induced Defense in Detached Uninfested Plant-Leaves - Effects on Behavior of Herbivores and Their Predators. *Oecologia* **1992**, *91*, 554-560.
- [10] M. Dicke, R. Gols, D. Ludeking, M.A. Posthumus, Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology* **1999**, *25*, 1907-1922.
- [11] T.C.J. Turlings, J.H. Tumlinson, W.J. Lewis, Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science* **1990**, *250*, 1251-1253.
- [12] C. Kost, M. Heil, Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology* **2006**, *94*, 619-628.
- [13] M. Heil, J.C. Silva Bueno, Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 5467-5472.
- [14] M. Miksch, W. Boland, Airborne methyl jasmonate stimulates the biosynthesis of furanocoumarins in the leaves of celery plants (*Apium graveolens*). *Experientia* **1996**, *52*, 739-743.

- [15] R. Karban, I.T. Baldwin, K.J. Baxter, G. Laue, G.W. Felton, Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* **2000**, *125*, 66-71.
- [16] U. Wittstock, J. Gershenzon, Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **2002**, *5*, 300-307.
- [17] L. Kunst, A.L. Samuels, Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **2003**, *42*, 51-80.
- [18] R. Jetter, S. Schaffer, M. Riederer, Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell and Environment* **2000**, *23*, 619-628.
- [19] R. Jetter, S. Schaffer, Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology* **2001**, *126*, 1725-1737.
- [20] P.E. Kolattukudy, J.S. Buckner, T.Y.J. Liu, Biosynthesis of Secondary Alcohols and Ketones from Alkanes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1973**, *156*, 613-620.
- [21] R. Nass, C. Markstadter, V. Hauke, M. Riederer, Quantitative gas chromatographic analysis of plant cuticular waxes containing long-chain aldehydes. *Phytochemical Analysis* **1998**, *9*, 112-118.
- [22] R. Jetter, M. Riederer, Long-chain alkanediols, ketoaldehydes, ketoalcohols and ketoalkyl esters in the cuticular waxes of *Osmunda regalis* fronds. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 907-915.
- [23] R. Jetter, M. Riederer, A. Seyer, C. Mioskowski, Homologous long-chain alkanediols from *Papaver* leaf cuticular waxes. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1617-1620.
- [24] C.P. Vermeer, P. Nastold, R. Jetter, Homologous very-long-chain 1,3-alkanediols and 3-hydroxyaldehydes in leaf cuticular waxes of *Ricinus communis* L. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 433-438.
- [25] E.A. Baker, *The Plant Cuticle - Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. Vol. 10*, 139-165, Academic Press, London New York, **1982**.
- [26] G. Liakopoulos, S. Stavrianakou, G. Karabourniotis, Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: Evidence for the chemical origin of the UV-induced blue fluorescence of stomata. *Annals of Botany* **2001**, *87*, 641-648.
- [27] R. Jetter, A. Klinger, S. Schaffer, Very long-chain phenylpropyl and phenylbutyl esters from *Taxus baccata* needle cuticular waxes. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 579-587.
- [28] T. Walton, *Methods in Plant Biochemistry: Lipids, Membranes and Aspects of Photobiology. Vol. 4*, 105-158, Academic Press, San Diego, **1990**.
- [29] P.J. Holloway, in *Linneon Society Symposium Series. Vol. 10* (Ed.: D.F. Cutler, Alvin, K.L., Price, C.E.), Academic Press, London New York, **1982**, pp. 1-32.
- [30] O. Guhling, C. Kinzler, M. Dreyer, G. Bringmann, R. Jetter, Surface composition of myrmecophilic plants: Cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. *Journal of Chemical Ecology* **2005**, *31*, 2323-2341.

- [31] R. Jetter, M. Riederer, Cuticular waxes from the leaves and fruit capsules of eight Papaveraceae species. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **1996**, *74*, 419-430.
- [32] M.D. Chadwick, D.F. Chamberlain, B.A. Knights, A.J. McAleese, S. Peters, D.W.H. Rankin, F. Sanderson, Analysis of leaf waxes as a taxonomic guide to Rhododendron subsection Taliensia. *Annals of Botany* **2000**, *86*, 371-384.
- [33] C. Muller, M. Hilker, Host finding and oviposition behavior in a chrysomelid specialist - The importance of host plant surface waxes. *Journal of Chemical Ecology* **2001**, *27*, 985-994.
- [34] W. Barthlott, C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen, H. Wilhelmi, Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **1998**, *126*, 237-260.
- [35] I. Meusel, C. Neinhuis, C. Markstadter, W. Barthlott, Ultrastructure, chemical composition, and recrystallization of epicuticular waxes: transversely ridged rodlets. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **1999**, *77*, 706-720.
- [36] M. Wen, C. Buschhaus, R. Jetter, Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1808-1817.
- [37] L. Samuels, L. Kunst, R. Jetter, Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology* **2008**, *59*, 683-707.
- [38] D. PostBeittenmiller, Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1996**, *47*, 405-430.
- [39] T. Shepherd, D.W. Griffiths, The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* **2006**, *171*, 469-499.
- [40] R. Jetter, L. Kunst, Plant surface lipid biosynthetic pathways and their utility for metabolic engineering of waxes and hydrocarbon biofuels. *Plant Journal* **2008**, *54*, 670-683.
- [41] P.E. Kolattukudy, Enzymatic Synthesis of Fatty Alcohols in Brassica-Oleracea. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1971**, *142*, 701-709.
- [42] J. Vioque, P.E. Kolattukudy, Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (*Pisum sativum* L). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1997**, *340*, 64-72.
- [43] F. Li, X. Wu, P. Lam, D. Bird, H. Zheng, L. Samuels, R. Jetter, L. Kunst, Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **2008**, *148*, 97-107.
- [44] S. Greer, M. Wen, D. Bird, X.M. Wu, L. Samuels, L. Kunst, R. Jetter, The cytochrome p450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **2007**, *145*, 653-667.
- [45] H.J. Channon, A.C. Chibnall, The ether-soluble substances of cabbage leaf cytoplasm. V. The isolation of n-nonacosane and di-n-tetradecyl ketone. *Biochemical Journal* **1929**, *23*, 168-175.

- [46] M. Gastambideodier, E. Lederer, Biosynthesis of Corynomycolic Acid from 2 Molecules of Palmitic Acid. *Nature* **1959**, *184*, 1563-1564.
- [47] P.E. Kolattukudy, Biosynthesis of Wax in Brassica Oleracea. *Biochemistry* **1965**, *4*, 1844-1855.
- [48] P.E. Kolattukudy, Biosynthesis of Wax in Brassica Oleracea . Relation of Fatty Acids to Wax. *Biochemistry* **1966**, *5*, 2265-2275.
- [49] P.E. Kolattukudy, R.H. Jaeger, R. Robinson, Biogenesis of Nonacosan-15-One in Brassica Oleracea - Dual Mechanisms in Synthesis of Long-Chain Compounds. *Nature* **1968**, *219*, 1038-1040.
- [50] P.E. Kolattukudy, Further Evidence for an Elongation-Decarboxylation Mechanism in Biosynthesis of Paraffins in Leaves. *Plant Physiology* **1968**, *43*, 375-383.
- [51] P.E. Kolattukudy, Biosynthesis of N-Hentriacontane (Nc31 Paraffin) in Leaves. *Plant Physiology* **1968**, *S 43*, S38-S53.
- [52] B. Hollenbach, L. Schreiber, W. Hartung, K.J. Dietz, Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* **1997**, *203*, 9-19.
- [53] J.C. Kader, Lipid-transfer proteins: A puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science* **1997**, *2*, 66-70.
- [54] D. Bird, F. Beisson, A. Brigham, J. Shin, S. Greer, R. Jetter, L. Kunst, X.W. Wu, A. Yephremov, L. Samuels, Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant Journal* **2007**, *52*, 485-498.
- [55] J.A. Pighin, H.Q. Zheng, L.J. Balakshin, I.P. Goodman, T.L. Western, R. Jetter, L. Kunst, A.L. Samuels, Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **2004**, *306*, 702-704.
- [56] H. Bargel, W. Barthlott, K. Koch, L. Schreiber, C. Neinhuis, *The Evolution of Plant Physiology: Plant cuticles - multifunctional interfaces between plant and environment. Vol. 1, 171-195*, Academic Press, London, **2004**.
- [57] M. Riederer, Cuticle as Barrier between Terrestrial Plants and the Atmosphere - Significance of Growth-Structure for Cuticular Permeability. *Naturwissenschaften* **1991**, *78*, 201-208.
- [58] M. Riederer, L. Schreiber, Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* **2001**, *52*, 2023-2032.
- [59] L. Schreiber, M. Riederer, K. Schorn, Mobilities of organic compounds in reconstituted cuticular wax of barley leaves: Effects of monodisperse alcohol ethoxylates on diffusion of pentachlorophenol and tetracosanoic acid. *Pesticide Science* **1996**, *48*, 117-124.
- [60] L. Schreiber, A Mechanistic Approach Towards Surfactant/Wax Interactions - Effects of Octaethyleneglycolmonododecylether on Sorption and Diffusion of Organic-Chemicals in Reconstituted Cuticular Wax of Barley Leaves. *Pesticide Science* **1995**, *45*, 1-11.
- [61] M. Riederer, L. Schreiber, in *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions* (Ed.: R.J. Hamilton), The Oily Press, West Ferry, **1995**, pp. 131-156.

- [62] W. Barthlott, C. Neinhuis, Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **1997**, *202*, 1-8.
- [63] P. Wagner, R. Furstner, W. Barthlott, C. Neinhuis, Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *Journal of Experimental Botany* **2003**, *54*, 1295-1303.
- [64] P.E. Kolattukudy, Enzymatic Penetration of the Plant Cuticle by Fungal Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **1985**, *23*, 223-250.
- [65] W. Barthlott, E. Wollenweber, *Zur Feinstruktur, Chemie und taxonomischen Signifikanz epicuticularer Wachse und ähnlicher Sekrete. Vol. 32*, Akad. Wiss. Lit. Mainz, Wiesbaden, **1981**.
- [66] D. Knoll, L. Schreiber, Plant-microbe interactions: Wetting of ivy (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms. *Microbial Ecology* **2000**, *40*, 33-42.
- [67] L. Schreiber, U. Krimm, D. Knoll, M. Sayed, G. Auling, R.M. Kroppenstedt, Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* **2005**, *166*, 589-594.
- [68] M. Schwab, G. Noga, W. Barthlott, The Significance of Epicuticular Waxes for Defense of Pathogens as Shown for *Botrytis-Cinerea* Infections in Kohlrabi and Pea-Plants. *Gartenbauwissenschaft* **1995**, *60*, 102-109.
- [69] G.K. Podila, L.M. Rogers, P.E. Kolattukudy, Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum-Gloeosporioides*. *Plant Physiology* **1993**, *103*, 267-272.
- [70] E.N. Inyang, T.M. Butt, A. Beckett, S. Archer, The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological Research* **1999**, *103*, 419-426.
- [71] A.W. Johnson, R.F. Severson, Leaf Surface Chemistry of Tobacco Budworm *Heliothis-Virescens* Resistant Tobacco *Nicotiana-Tabacum*. *Journal of Agricultural Entomology* **1984**, *1*, 23-32.
- [72] D.H. Katz, J.F. Marcelletti, M.H. Khalil, L.E. Pope, L.R. Katz, Antiviral Activity of 1-Docosanol, an Inhibitor of Lipid-Enveloped Viruses Including Herpes-Simplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 10825-10829.
- [73] D.K. Bergman, J.W. Dillwith, A.A. Zarrabi, J.L. Caddel, R.C. Berberet, Epicuticular Lipids of Alfalfa Relative to Its Susceptibility to Spotted Alfalfa Aphids (Homoptera, Aphididae). *Environmental Entomology* **1991**, *20*, 781-785.
- [74] S.K. Ries, V. Wert, C.C. Sweeley, R.A. Leavitt, Triacontanol - New Naturally Occurring Plant-Growth Regulator. *Science* **1977**, *195*, 1339-1341.
- [75] K. Reifenrath, M. Riederer, C. Muller, Leaf surface wax layers of Brassicaceae lack feeding stimulants for *Phaedon cochleariae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **2005**, *115*, 41-50.
- [76] S.D. Eigenbrode, K.E. Espelie, Effects of Plant Epicuticular Lipids on Insect Herbivores. *Annual Review of Entomology* **1995**, *40*, 171-194.
- [77] S.D. Eigenbrode, R. Jetter, Attachment to plant surface waxes by an insect predator. *Integrative and Comparative Biology* **2002**, *42*, 1091-1099.

- [78] S.D. Eigenbrode, The effects of plant epicuticular waxy blooms on attachment and effectiveness of predatory insects. *Arthropod Structure & Development* **2004**, *33*, 91-102.
- [79] H. Tsumuki, K. Kanehisa, K. Kawada, Leaf Surface Wax as a Possible Resistance Factor of Barley to Cereal Aphids. *Applied Entomology and Zoology* **1989**, *24*, 295-301.
- [80] S.D. Eigenbrode, N.N. Kabalo, C.E. Rutledge, Potential of reduced-waxbloom oilseed Brassica for insect pest resistance. *Journal of Agricultural and Urban Entomology* **2000**, *17*, 53-63.
- [81] N.E. Stork, Role of Waxblooms in Preventing Attachment to Brassicas by the Mustard Beetle, *Phaedon-Cochleariae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **1980**, *28*, 100-107.
- [82] W. Federle, U. Maschwitz, B. Fiala, M. Riederer, B. Holldobler, Slippery ant-plants and skilful climbers: selection and protection of specific ant partners by epicuticular wax blooms in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Oecologia* **1997**, *112*, 217-224.
- [83] C. Markstadter, W. Federle, R. Jetter, M. Riederer, B. Holldobler, Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants. *Chemoecology* **2000**, *10*, 33-40.
- [84] M. Riedel, A. Eichner, R. Jetter, Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta* **2003**, *218*, 87-97.
- [85] M. Riedel, A. Eichner, H. Meimberg, R. Jetter, Chemical composition of epicuticular wax crystals on the slippery zone in pitchers of five *Nepenthes* species and hybrids. *Planta* **2007**, *225*, 1517-1534.
- [86] D.W. Eveling, Scanning Electron-Microscopy of Damage by Dust Deposits to Leaves and Petals. *Botanical Gazette* **1986**, *147*, 159-165.
- [87] T.G. Knight, M.A.B. Wallwork, M. Sedgley, Leaf epicuticular wax and cuticle ultrastructure of four *Eucalyptus* species and their hybrids. *International Journal of Plant Sciences* **2004**, *165*, 27-36.
- [88] W.L. Mechaber, D.B. Marshall, R.A. Mechaber, R.T. Jobe, F.S. Chew, Mapping leaf surface landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 4600-4603.
- [89] K. Koch, C. Neinhuis, H.J. Ensikat, W. Barthlott, Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM). *Journal of Experimental Botany* **2004**, *55*, 711-718.
- [90] H.S. Yang, H.J. An, G.P. Feng, Y.F. Li, Visualization and quantitative roughness analysis of peach skin by atomic force microscopy under storage. *Lwt-Food Science and Technology* **2005**, *38*, 571-577.
- [91] D. Canet, R. Rohr, A. Chamel, F. Guillain, Atomic force microscopy study of isolated ivy leaf cuticles observed directly and after embedding in Epon(R). *New Phytologist* **1996**, *134*, 571-577.
- [92] H.J. Ensikat, C. Neinhuis, W. Barthlott, Direct access to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method. *International Journal of Plant Sciences* **2000**, *161*, 143-148.

- [93] K. Koch, A. Dommissé, W. Barthlott, Chemistry and crystal growth of plant wax tubules of lotus (*Nelumbo nucifera*) and nasturtium (*Tropaeolum majus*) leaves on technical substrates. *Crystal Growth & Design* **2006**, *6*, 2571-2578.
- [94] P. Matejka, L. Pleserová, G. Budinová, K. Havířová, X. Mulet, F. Skácel, K. Volka, Vibrational biospectroscopy: what can we say about the surface wax layer of Norway spruce needles? *Journal of Molecular Structure* **2001**, *565*, 305-310.
- [95] B.R. da Luz, Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: a tool for ecological and botanical studies. *New Phytologist* **2006**, *172*, 305-318.
- [96] S. Merk, A. Blume, M. Riederer, Phase behaviour and crystallinity of plant cuticular waxes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Planta* **1998**, *204*, 44-53.
- [97] L.C. Prinsloo, W. du Plooy, C. van der Merwe, Raman spectroscopic study of the epicuticular wax layer of mature mango (*Mangifera indica*) fruit. *Journal of Raman Spectroscopy* **2004**, *35*, 561-567.
- [98] E.A. Veraverbeke, J. Lammertyn, B.M. Nicolai, J. Irudayaraj, Spectroscopic evaluation of the surface quality of apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1046-1051.
- [99] E.N. Dubis, A.T. Dubis, J.W. Morzycki, Comparative analysis of plant cuticular waxes using HATR FT-IR reflection technique. *Journal of Molecular Structure* **1999**, *512*, 173-179.
- [100] E.N. Dubis, A.T. Dubis, J. Poplawski, Determination of the aromatic compounds in plant cuticular waxes using FT-IR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **2001**, *596*, 83-88.
- [101] D. Stewart, Fourier transform infrared microspectroscopy of plant tissues. *Applied Spectroscopy* **1996**, *50*, 357-365.
- [102] M. Mascarenhas, J. Dighton, G.A. Arbuckle, Characterization of plant carbohydrates and changes in leaf carbohydrate chemistry due to chemical and enzymatic degradation measured by microscopic ATR FT-IR spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2000**, *54*, 681-686.
- [103] H. Schulz, M. Baranska, R. Baranski, Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers* **2005**, *77*, 212-221.
- [104] P.R. Greene, C.D. Bain, Total internal reflection Raman spectroscopy of barley leaf epicuticular waxes in vivo. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2005**, *45*, 174-180.
- [105] M.M.L. Yu, H.G. Schulze, R. Jetter, M.W. Blades, R.F.B. Turner, Raman microspectroscopic analysis of triterpenoids found in plant cuticles. *Applied Spectroscopy* **2007**, *61*, 32-37.
- [106] M.C. Perkins, C.J. Roberts, D. Briggs, M.C. Davies, A. Friedmann, C.A. Hart, G.A. Bell, Surface morphology and chemistry of *Prunus laurocerasus* L. leaves: a study using X-ray photoelectron spectroscopy, time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, atomic-force microscopy and scanning-electron microscopy. *Planta* **2005**, *221*, 123-134.

- [107] A.N. Round, B. Yan, S. Dang, R. Estephan, R.E. Stark, J.D. Batteas, The influence of water on the nanomechanical behavior of the plant biopolyester cutin as studied by AFM and solid-state NMR. *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 2761-2767.
- [108] C. Gilly, R. Rohr, A. Chamel, Ultrastructure and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L) plants in vitro and during ex vitro acclimatization. *Annals of Botany* **1997**, *80*, 139-145.
- [109] G. Bianchi, G. Vlahov, C. Anglani, C. Murelli, Epicuticular Wax of Olive Leaves. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 49-52.
- [110] M.A. Sonibare, A.A. Jayeola, A. Egunyomi, Chemotaxonomic significance of leaf alkanes in species of *Ficus* (Moraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, *33*, 79-86.
- [111] P.J. Holloway, in *Handbook of Chromatography. Lipids. Vol. 1* (Eds.: H.K. Mangold, G. Zweig, J. Sherma), CRC Press, Boca Raton, **1984**, pp. 347-380.
- [112] W.H. Orgell, The Isolation of Plant Cuticle with Pectic Enzymes. *Plant Physiology* **1955**, *30*, 78-80.
- [113] Y. Yamada, S.H. Wittwer, M.J. Bukovac, Penetration of Organic Compounds through Isolated Cuticles with Special Reference to Urea. *Plant Physiology* **1964**, *39*, 170-175.
- [114] P.D. Petracek, M.J. Bukovac, Rheological Properties of Enzymatically Isolated Tomato Fruit Cuticle. *Plant Physiology* **1995**, *109*, 675-679.
- [115] L. Stammitti, S. Derridj, J.P. Garrec, Leaf epicuticular lipids of *Prunus laurocerasus*: Importance of extraction methods. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 45-48.
- [116] F. Gniwotta, G. Vogg, V. Gartmann, T.L.W. Carver, M. Riederer, R. Jetter, What do microbes encounter at the plant surface ? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. *Plant Physiology* **2005**, *139*, 519-530.
- [117] C. Neinhuis, K. Koch, W. Barthlott, Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* **2001**, *213*, 427-434.
- [118] R. Petry, M. Schmitt, J. Popp, Raman Spectroscopy - A prospective tool in the life sciences. *Chemphyschem* **2003**, *4*, 14-30.
- [119] M.M.L. Yu, S.O. Konorov, H.G. Schulze, M.W. Blades, R.F.B. Turner, R. Jetter, In situ analysis by microspectroscopy reveals triterpenoid compositional patterns within leaf cuticles of *Prunus laurocerasus*. *Planta* **2008**, *227*, 823-834.
- [120] P. Yu, D.A. Christensen, C.R. Christensen, M.D. Drew, B.G. Rossnagel, J.J. McKinnon, Use of synchrotron FTIR microspectroscopy to identify chemical differences in barley endosperm tissue in relation to rumen degradation characteristics. *Canadian Journal of Animal Science* **2004**, *84*, 523-527.
- [121] P. Heraud, S. Caine, G. Sanson, R. Gleadow, B.R. Wood, D. McNaughton, Focal plane array infrared imaging: a new way to analyse leaf tissue. *New Phytologist* **2007**, *173*, 216-225.
- [122] I.W. Levin, R. Bhargava, Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: Integrating microscopy and molecular recognition. *Annual Review of Physical Chemistry* **2005**, *56*, 429-474.

- [123] D.C. Fernandez, R. Bhargava, S.M. Hewitt, I.W. Levin, Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition. *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 469-474.
- [124] P.Q. Yu, J.J. McKinnon, C.R. Christensen, D.A. Christensen, N.S. Marinkovic, L.M. Miller, Chemical imaging of microstructures of plant tissues within cellular dimension using synchrotron infrared microspectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6062-6067.
- [125] P.Q. Yu, J.J. McKinnon, C.R. Christensen, D.A. Christensen, Using synchrotron transmission FTIR microspectroscopy as a rapid, direct, and nondestructive analytical technique to reveal molecular microstructural-chemical features within tissue in grain barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 1484-1494.
- [126] D.S. Cornett, M.L. Reyzer, P. Chaurand, R.M. Caprioli, MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nature Methods* **2007**, *4*, 828-833.
- [127] M.L. Reyzer, R.M. Caprioli, MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 29-35.
- [128] T. Kondo, S. Sawa, A. Kinoshita, S. Mizuno, T. Kakimoto, H. Fukuda, Y. Sakagami, A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* **2006**, *313*, 845-848.
- [129] K. Camman, *Instrumentelle Analytische Chemie:Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **2001**.
- [130] S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J.L. Herman, T.A. Gillespie, R.M. Caprioli, Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6448-6456.
- [131] T.C. Rohner, D. Staab, M. Stoeckli, MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mechanisms of Ageing and Development* **2005**, *126*, 177-185.
- [132] R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile, Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4751-4760.
- [133] P.J. Trim, S.J. Atkinson, A.P. Princivalle, P.S. Marshall, A. West, M.R. Clench, Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging of lipids in rat brain tissue with integrated unsupervised and supervised multivariate statistical analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 1503-1509.
- [134] A.K. Mullen, M.R. Clench, S. Crosland, K.R. Sharples, Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2507-2516.
- [135] S. Robinson, K. Warburton, M. Seymour, M. Clench, J. Thomas-Oates, Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytologist* **2007**, *173*, 438-444.

- [136] R. Shroff, F. Vergara, A. Muck, A. Svatos, J. Gershenzon, Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 6196-6201.
- [137] L. Stammitti, J.P. Garrec, S. Derridj, Permeability of Isolated Cuticles of *Prunus-Laurocerasus* to Soluble Carbohydrate. *Plant Physiology and Biochemistry* **1995**, *33*, 319-326.
- [138] T. Kirsch, F. Kaffarnik, M. Riederer, L. Schreiber, Cuticular permeability of the three tree species *Prunus laurocerasus* L, *Ginkgo biloba* L and *Juglans regia* L: Comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes. *Journal of Experimental Botany* **1997**, *48*, 1035-1045.
- [139] S. Shimma, M. Furuta, K. Ichimura, Y. Yoshida, M. Setou, Direct MS/MS analysis in mammalian tissue sections using MALDI-QIT-TOFMS and chemical inkjet technology. *Surface and Interface Analysis* **2006**, *38*, 1712-1714.
- [140] T.K. Dutta, S. Harayama, Time-of-flight mass spectrometric analysis of high-molecular-weight alkanes in crude oil by silver nitrate chemical ionization after laser desorption. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 864-869.
- [141] J.K. Pruns, J.P. Vietzke, M. Strassner, C. Rapp, U. Hintze, W.A. König, Characterization of low molecular weight hydrocarbon oligomers by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a solvent-free sample preparation method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 208-211.
- [142] C. Sluszný, E.S. Yeung, B.J. Nikolau, In-situ probing of the biotic-abiotic boundary of plants by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 107-115.
- [143] J. Cvacka, A. Svatos, Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of lipids and high molecular weight hydrocarbons with lithium 2,5-dihydroxybenzoate matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 2203-2207.
- [144] J. Cvacka, P. Jiros, J. Sobotnik, R. Hanus, A. Svatos, Analysis of insect cuticular hydrocarbons using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Chemical Ecology* **2006**, *32*, 409-434.
- [145] J. Becher, A. Muck, A. Mithofer, A. Svatos, W. Boland, Negative ion mode matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometric analysis of oligosaccharides using halide adducts and 9-aminoacridine matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 1153-1158.
- [146] J.D. More, N.S. Finney, A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with, o-iodoxybenzoic acid (IBX). *Organic Letters* **2002**, *4*, 3001-3003.
- [147] A.P. Thottumkara, T.K. Vinod, Synthesis and oxidation reactions of a user- and eco-friendly hypervalent iodine reagent. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 569-572.
- [148] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, A user-friendly entry to 2-iodoxybenzoic acid (IBX). *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 4537-4538.

- [149] R.L. Grob, E.F. Barry, in *Modern Practice of Gas Chromatography*, 3 ed. (Ed.: R. Grob), John Wiley & Sons Inc, New York, **1995**, pp. 274-281.
- [150] G. Bianchi, P. Avato, O. Scarpa, C. Murelli, G. Audisio, A. Rossini, Composition and Structure of Maize Epicuticular Wax Esters. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 165-171.
- [151] G. Bianchi, C. Murelli, G. Vlahov, Surface Waxes from Olive Fruits. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3503-3506.
- [152] R.A. Franich, L.G. Wells, P.T. Holland, Epicuticular Wax of Pinus-Radiata Needles. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1617-1623.
- [153] A.P. Tulloch, Epicuticular Wax of Eragrostis-Curvula. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 661-664.
- [154] B.M. Szafranek, E.E. Synak, Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 80-90.
- [155] M. Nazir, W. Ahmad, N.A. Rabi, S.A. Khan, Epicuticular Leaf Wax of Euphorbia-Helioscopia L (Euphorbiaceae). *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **1993**, *48*, 5-9.
- [156] C. Lai, L. Kunst, R. Jetter, Composition of alkyl esters in the cuticular wax on inflorescence stems of Arabidopsis thaliana cer mutants. *Plant Journal* **2007**, *50*, 189-196.
- [157] B.B. Dean, P.E. Kolattukudy, Synthesis of Suberin During Wound-Healing in Jade Leaves, Tomato Fruit, and Bean Pods. *Plant Physiology* **1976**, *58*, 411-416.
- [158] L. Schreiber, R. Franke, K. Hartmann, Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration. *Planta* **2005**, *220*, 520-530.
- [159] R. Thomas, X.X. Fang, K. Ranathunge, T.R. Anderson, C.A. Peterson, M.A. Bernards, Soybean root suberin: Anatomical distribution, chemical composition, and relationship to partial resistance to Phytophthora sojae. *Plant Physiology* **2007**, *144*, 299-311.
- [160] P.E. Kolattukudy, Bio-Polyester Membranes of Plants - Cutin and Suberin. *Science* **1980**, *208*, 990-1000.
- [161] P.E. Kolattukudy, Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutin and Suberin. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1981**, *32*, 539-567.
- [162] P.E. Kolattukudy, B.B. Dean, Structure, Gas-Chromatographic Measurement, and Function of Suberin Synthesized by Potato-Tuber Tissue-Slices. *Plant Physiology* **1974**, *54*, 116-121.
- [163] B.B. Dean, P.E. Kolattukudy, Biochemistry of Suberization - Incorporation of [1-C-14]Oleic Acid and [1-C-14]Acetate into Aliphatic Components of Suberin in Potato-Tuber Disks (*Solanum-Tuberosum*). *Plant Physiology* **1977**, *59*, 48-54.
- [164] R. Franke, I. Briesen, T. Wojciechowski, A. Faust, A. Yephremov, C. Nawrath, L. Schreiber, Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues - A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2643-2658.

- [165] N.P. Sukumaran, J.S. Jassal, S.C. Verma, Quantitative-Determination of Suberin Deposition During Wound-Healing in Potatoes (*Solanum-Tuberosum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, *51*, 271-274.
- [166] M. Pollard, F. Beisson, Y.H. Li, J.B. Ohlrogge, Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* **2008**, *13*, 236-246.
- [167] H. Butin, Die "Schrotschusskrankheit" des Kirschlorbeers (*Prunus laurocerasus*): alte und neue Erreger = The shot-hole disease of Cherry laurel (*Prunus laurocerasus*): old and new pathogens. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienste* **2003**, *55*, 51-53.
- [168] M.J.F. Gregor, Disease of cherry laurel caused by *Trochila Laurocerasi* (Desm) Fr. *Annals of Applied Biology* **1936**, *23*, 700-U705.
- [169] S.C. Wu, S. Kauffmann, A.G. Darvill, P. Albersheim, Purification, Cloning and Characterization of 2 Xylanases from *Magnaporthe-Grisea*, the Rice Blast Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **1995**, *8*, 506-514.
- [170] M. Pauly, L.N. Andersen, S. Kauppinen, L.V. Kofod, W.S. York, P. Albersheim, A. Darvill, A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology* **1999**, *9*, 93-100.
- [171] R. Carapito, D. Hatsch, S. Vorwerk, E. Petkovski, J.M. Jeltsch, V. Phalip, Gene expression in *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Fungal Genetics and Biology* **2008**, *45*, 738-748.
- [172] P. Baldrian, V. Valaskova, Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *Fems Microbiology Reviews* **2008**, *32*, 501-521.
- [173] K. Mendgen, in *Plant Cuticles: an integrated functional approach. Vol. 8* (Ed.: G. Kerstiens), BIOS Scientific Publishers, Oxford, **1996**, pp. 175-188.
- [174] U. Nehls, N. Grunze, M. Willmann, M. Reich, H. Kuster, Sugar for my honey: Carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 82-91.
- [175] H. Zollner, R. Giebelmann, Cyanogenic glycosides in food - Cultural historical remarks. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **2007**, *103*, 71-77.
- [176] P. Kakes, Properties and Functions of the Cyanogenic System in Higher-Plants. *Euphytica* **1990**, *48*, 25-43.
- [177] L. Brimer, A.R. Cicalini, F. Federici, M. Petruccioli, Amygdalin degradation by *Mucor circinelloides* and *Penicillium aurantiogriseum*: mechanisms of hydrolysis. *Archives of Microbiology* **1998**, *169*, 106-112.
- [178] D.A. Jones, Cyanogenesis in Animal-Plant Interactions. *Ciba Foundation Symposia* **1988**, *140*, 151-170.
- [179] A. Nahrstedt, Cyanogenic Compounds as Protecting Agents for Organisms. *Plant Systematics and Evolution* **1985**, *150*, 35-47.
- [180] A. Mosblech, S. Konig, I. Stenzel, P. Grzeganeck, I. Feussner, I. Heilmann, Phosphoinositide and inositolpolyphosphate signalling in defense responses of *Arabidopsis thaliana* challenged by mechanical wounding. *Molecular Plant* **2008**, *1*, 249-261.

- [181] M.M. Nagiec, E.E. Nagiec, J.A. Baltisberger, G.B. Wells, R.L. Lester, R.C. Dickson, Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs - Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 9809-9817.
- [182] C. Simenel, B. Coddeville, M. Delepierre, J.P. Latge, T. Fontaine, Glycosylinositolphosphoceramides in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* **2008**, 18, 84-96.
- [183] R.L. Bialeski, in *Encyclopedia of plant physiology-Plant carbohydrates. Vol. 13A* (Eds.: F.A. Loewus, W. Tanner), Springer-Verlag, Berlin, **1982**, pp. 158-192.
- [184] R.L. Bialeski, Accumulation of Sorbitol and Glucose by Leaf Slices of Rosaceae. *Australian Journal of Plant Physiology* **1977**, 4, 11-24.
- [185] M.H. Zimmermann, H. Ziegler, in *Encyclopedia of plant physiology - Transport in plants. Vol. 1* (Eds.: M.H. Zimmermann, J.A. Milburn), Springer-Verlag, Berlin, **1975**, pp. 479-503.
- [186] T. Link, G. Lohaus, I. Heiser, K. Mendgen, M. Hahn, R.T. Voegelé, Characterization of a novel NADP(+)-dependent D-arabitol dehydrogenase from the plant pathogen *Uromyces fabae*. *Biochemical Journal* **2005**, 389, 289-295.
- [187] N. Smirnoff, Q.J. Cumbes, Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. *Phytochemistry* **1989**, 28, 1057-1060.
- [188] B. Shen, R.G. Jensen, H.J. Bohnert, Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* **1997**, 115, 527-532.
- [189] B. Shen, R.G. Jensen, H.J. Bohnert, Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology* **1997**, 113, 1177-1183.

7 Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Boland für die Bereitstellung und Unterstützung bei der Bearbeitung dieses sehr vielseitigen und interessanten Themengebietes bedanken. Das hohe Maß an freier Arbeitsgestaltung ermöglichte mir die Entwicklung meiner fachlichen Qualifikationen insbesondere auf dem Gebiet der Bioorganischen Chemie und Instrumentellen Analytik. Dabei konnte ich mir stets seiner wissenschaftlichen, fachlichen und ideellen Hilfe gewiss sein.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. D. Klemm. In seiner Arbeitsgruppe konnte ich bereits als studentische Hilfskraft und später während meiner Diplomarbeit vertiefenden Einblick in den Bereich der Zucker- und Naturstoffchemie gewinnen, was mich entscheidend bei der Wahl des Fachgebietes und meines Dissertationsthemas beeinflusst hat.

Für all die Unterstützung, Hilfe, interessanten Gespräche und insbesondere für das freundschaftliche, kollegiale Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes bedanken. Besonderer Dank gilt dabei allen Kollegen der Abteilung Bioorganische Chemie, insbesondere Angelika für die Anzucht und liebevolle Pflege aller Pflanzen, Dieter für stets offene Ohren und ehrliche Kritik bei fachlichen Problemen, der Abteilung Massenspektrometrie für Ihre Unterstützung bei den Entwicklungen und Messungen am MALDI-TOF, Andreas, Nicolas, Anne, Roy und dem gesamten „S-3“-Büro (Stefan, Stefan, Sabrina) für die freundschaftliche Unterstützung, die inspirierenden Mittagsgespräche und stets offene Ohren bei privaten Problemen.

Besonders Stefan möchte ich für seine Unterstützung bei technischen und methodischen Fragen, sowie für seine Ausdauer und Anregungen bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit danken.

Ich möchte mich ebenfalls für die hilfsbereite und angenehme Zusammenarbeit bei den Mitarbeitern des Elektronenmikroskopischen Instituts der Friedrich-Schiller-Universität bedanken. Insbesondere des interessierten und aufgeschlossenen Einsatzes von Frau Herrmann und Frau Linde verdanke ich die Vielzahl faszinierender Aufnahmen und den mir so ermöglichten Einblick in die strukturelle Vielfalt der Blattoberflächen.

Allen Freunden, Wegbegleitern, Kommilitonen und Bekannten, die mich durch mein Studium und die Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und gestützt haben, möchte ich an dieser Stellen ebenfalls meinen Dank aussprechen.

In den letzten Monaten dürfte ich mir der stetigen und liebevollen Unterstützung einer besonderen Person sicher sein, ohne die die Fertigstellung meiner Arbeit so sicher nicht möglich gewesen wäre. Für seine Geduld und das viele Verständnis möchte ich Christian aufrichtig danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir seit Anbeginn meiner wissenschaftlichen Laufbahn mit all ihrer Geduld, Hilfsbereitschaft, Liebe und ihrem Verständnis zur Seite standen. Durch ihren Rückhalt, ihren Rat und die vielen aufbauenden Worte besonders in Zeiten geringerer Motivation haben sie den größten Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Fiedler
Vorname	Andrea
Geburtsdatum	23. April 1980
Geburtsort	Berlin
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

seit 01/2005	Doktorandin am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena, Abteilung für Bioorganische Chemie
11/2004 – 12/2004	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Klemm
10/2004	Studienabschluss als Diplom-Chemikerin
06/2002 – 09/2003	Studentische Hilfskraft am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Mitarbeit im Rahmen des SFB 436: „Metallvermittelte Reaktionen nach dem Vorbild der Natur“
10/1999 – 10/2004	Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fachrichtung Diplom-Chemie
06/1999	Abitur am 1. Gymnasium „Alexander-von-Humboldt“, Berlin-Köpenick
09/1992 – 06/1999	Besuch des 1. Gymnasiums „Alexander-von-Humboldt“, Berlin-Köpenick
09/1991 – 07/1992	Besuch der 13. Grundschule „Judith Auer“, Berlin-Köpenick
09/1988 – 07/1991	Besuch der 5. Oberschule „Conrad Blenkle“, Berlin-Köpenick
09/1986 – 07/1988	Besuch der 31. Oberschule, Berlin-Köpenick

Publikationen

Fiedler, A.; Svatos, A.; Muck, A.; Boland, W. **2008**. Combined FT-IR and MALDI-TOF-MS Imaging: Topical analysis of plant surface chemistry. *In Vorbereitung*.

Fiedler, A.; Bartram, S.; Boland, W. **2008**. The Lima bean leaf waxes: Composition, local differences and dynamical changes. *In Vorbereitung*.

Kofer, W.; Weir, T.; van Haren, M.; Fritchman, C.; Gonzales, P.; Bartram, S.; Fiedler, A.; Vivanco, J.M.; Cosio, E.G. **2008**. Who needs a bodyguard if you can have *Pseudomyrmex* ants? *In Vorbereitung*.

Koth, D.; Fiedler, A.; Scholz, S.; Gottschaldt, M. Synthesis of different 3,5-diazidofuranoses: A new and general synthesis pathway. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2007**, 26, 267-278.

Wissenschaftliche Fachbeiträge

Fiedler, A.; Boland, W. **2007**. Qualitative and quantitative surface imaging - distribution and composition of cuticular waxes from *P. laurocerasus* leaf surface. Poster. Evaluierung der "International Max Planck Research School" (IMPRS).

Fiedler, A.; Boland, W. **2007**. New Approaches in Plant Surface Analysis. Poster. 6th Biannual IMPRS Symposium.

Fiedler, A. **2006**. Exploring new land - cartography of leaf surfaces. Vortrag., 5th Biannual IMPRS Symposium.

Fiedler, A.; Boland, W. **2006**. New Approaches in Plant Surface Analysis. Poster. 4th Euro Fed Lipid Congress - Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future, Madrid.

Fiedler, A., Boland, W. **2006**. Exploring new land - cartography of leaf surfaces. Poster. 4th Biannual IMPRS Symposium.

Fiedler, A. **2005**. Fine feathers make fine birds. Vortrag. 3rd Biannual IMPRS Symposium.

Fiedler, A. **2005**. Oberflächenanalytik von Blattwachsen. Vortrag vor Biologie- und Chemielehrern der Sekundarstufe II.

Fiedler, A.; Boland, W. **2005**. The development of a new method to observe changes in plant epicuticular waxes under stressful conditions. Poster. 2nd Biannual IMPRS Symposium.

.....
Andrea Fiedler

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Andrea Fiedler, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den

.....

Andrea Fiedler

9 Anhang

9.1 ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, EI-MS- und IR-Spektren

$^7\text{Lithium-2,5-dihydroxybenzoat (1)}$

Eicosylacetat (2)

Tetracosylacetat (3)

Hexacosylacetat (4)

Octacosylacetat (5)

Triacontanylacetat (6)

2-Iodoxybenzoesäure (7)

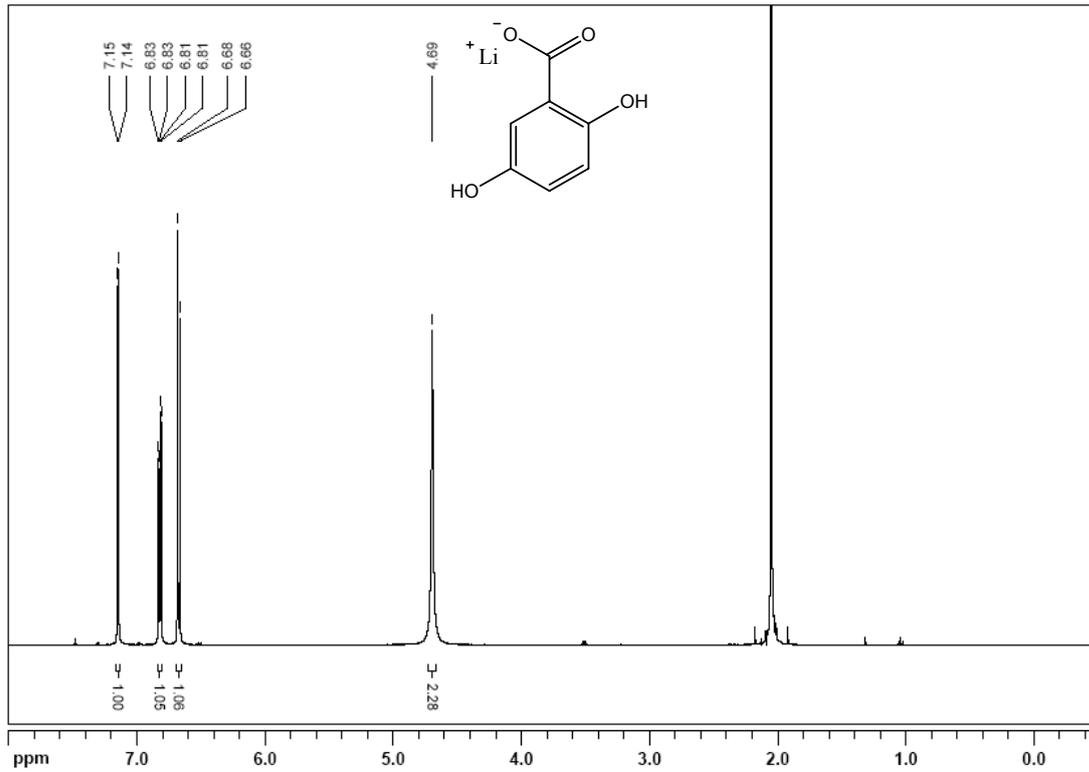
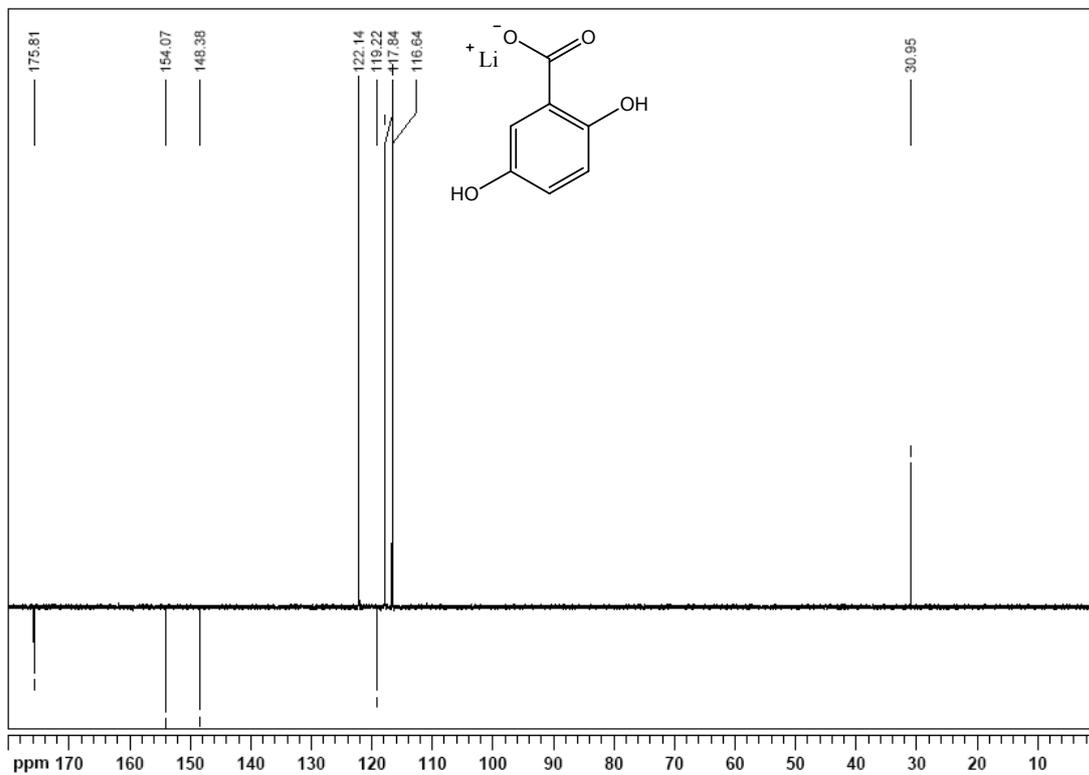
Docosanal (8)

Tetracosanal (9)

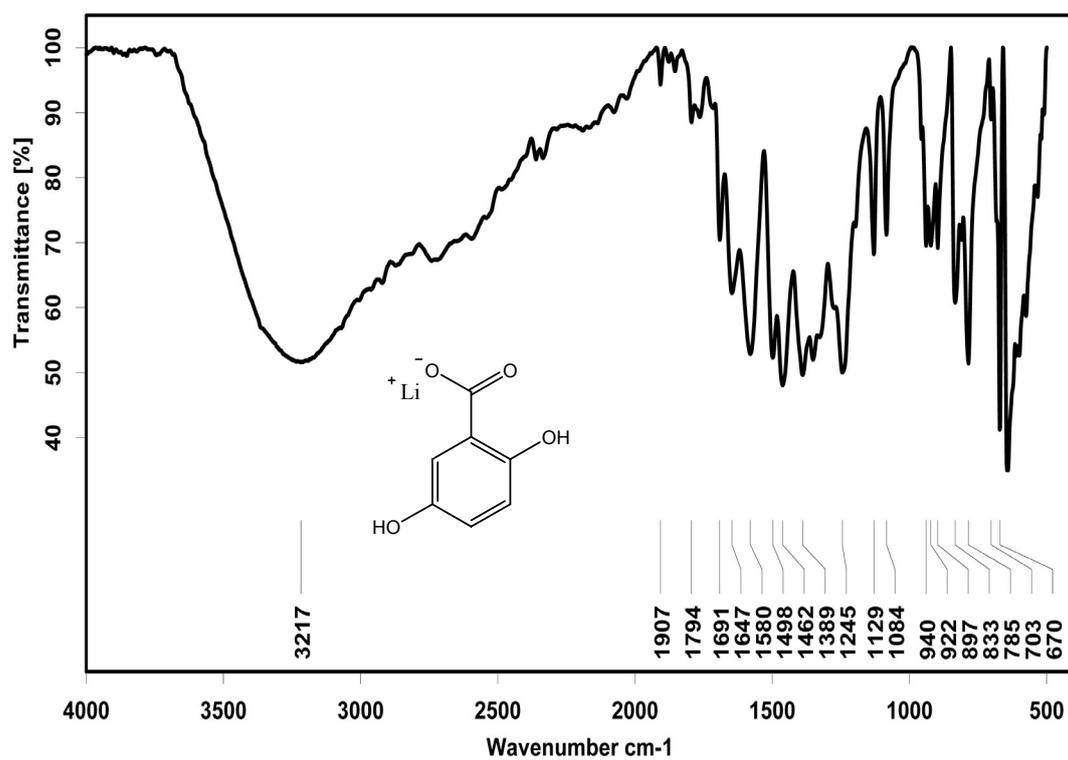
Hexacosanal (10)

Octacosanal (11)

Triacontanal (12)

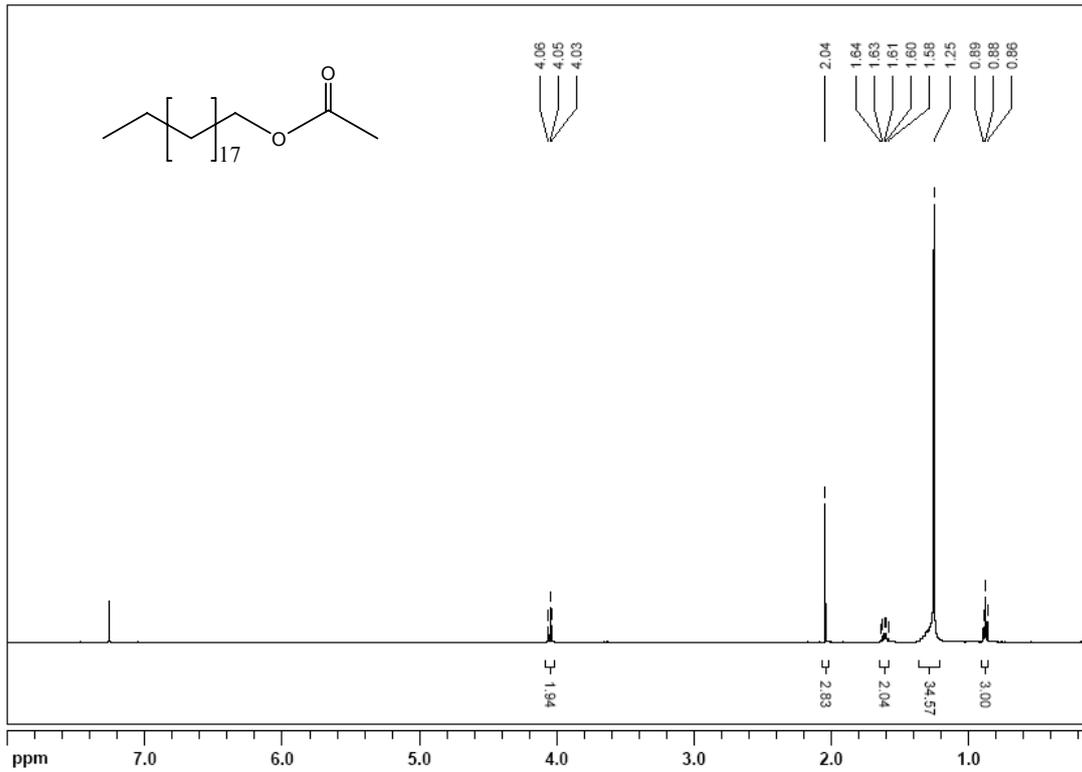
⁷Lithium-2,5-dihydroxybenzoat (1)**¹H-NMR****¹³C-NMR**

IR

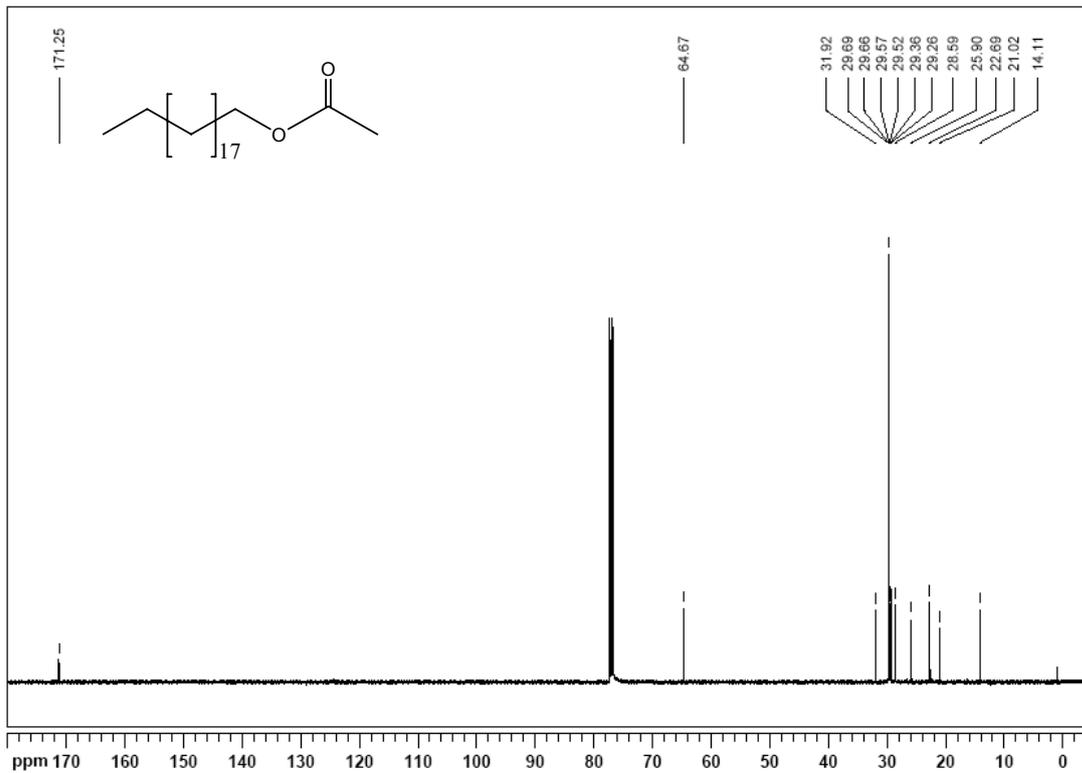


Eicosylacetat (2)

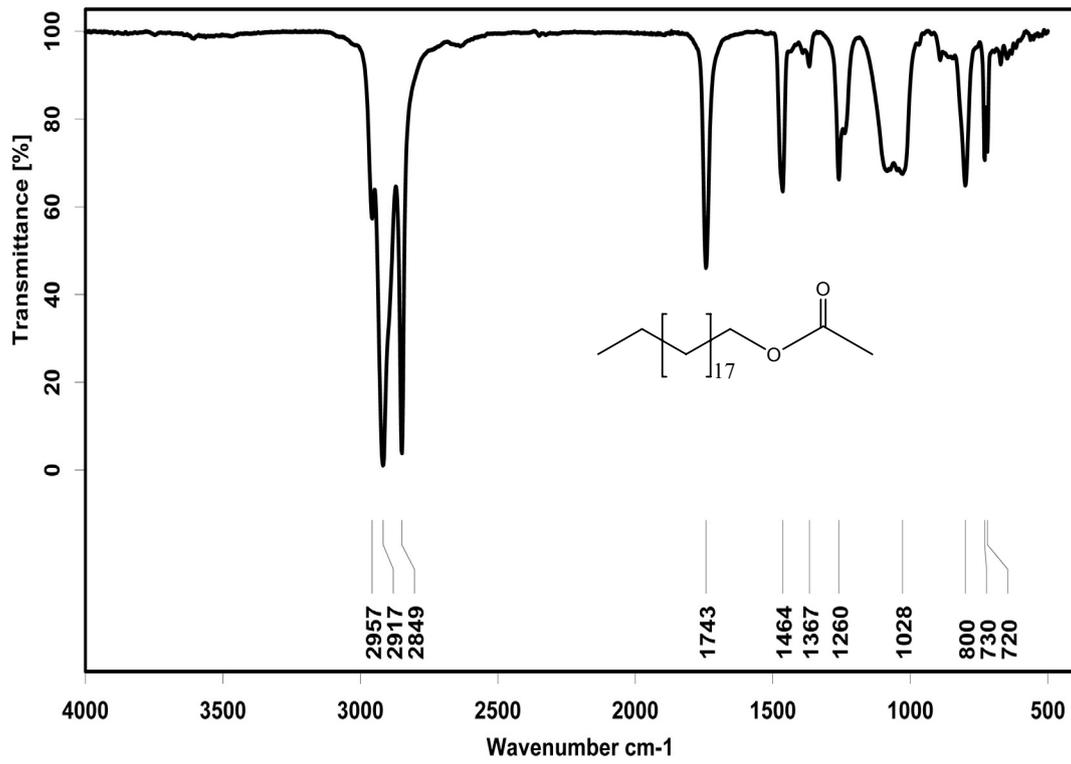
¹H-NMR



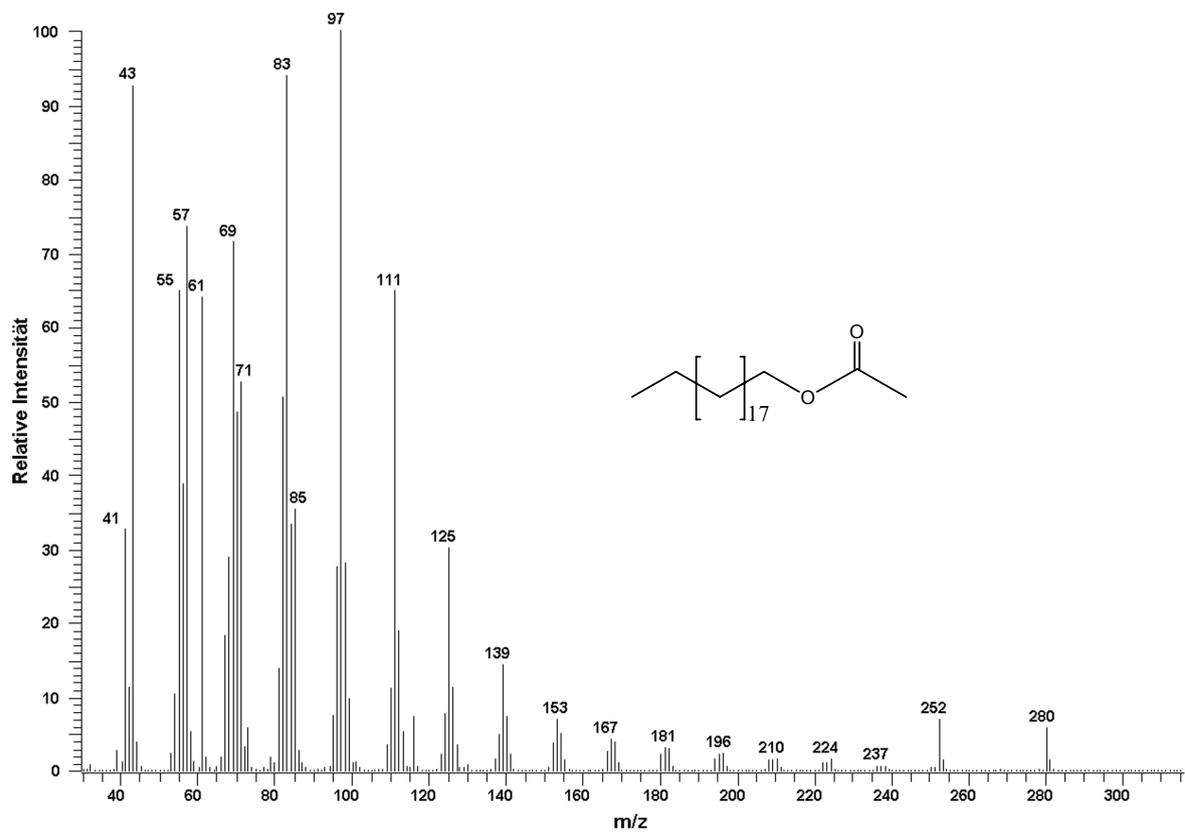
¹³C-NMR

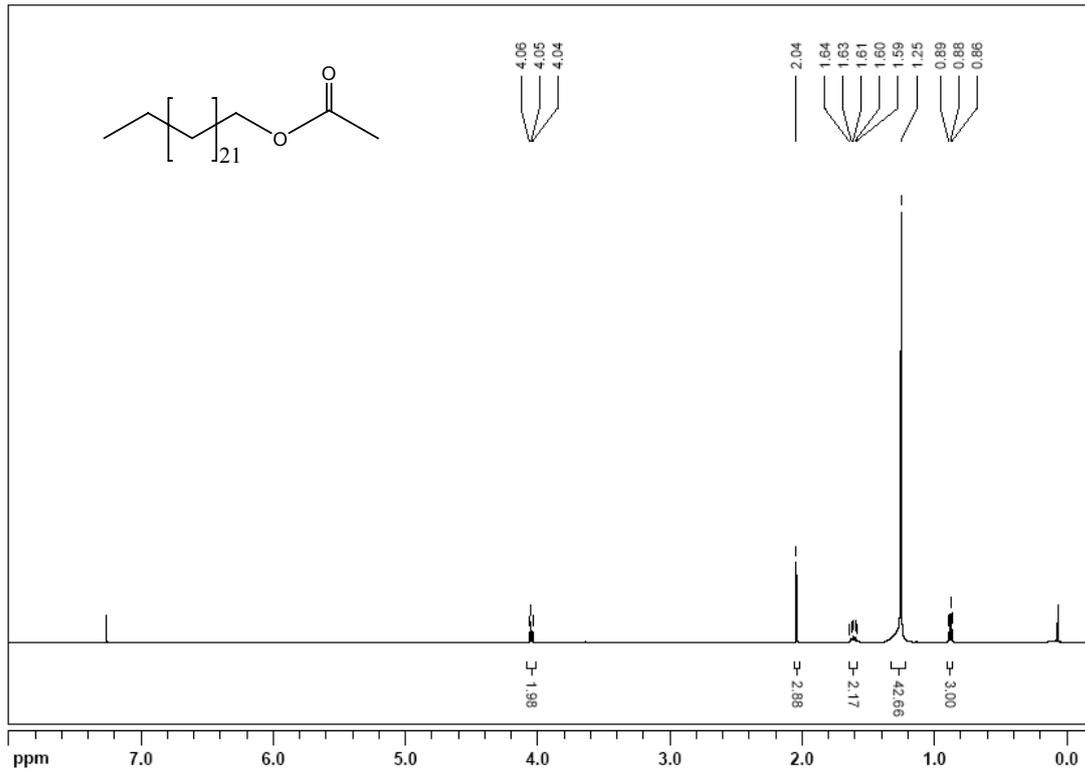
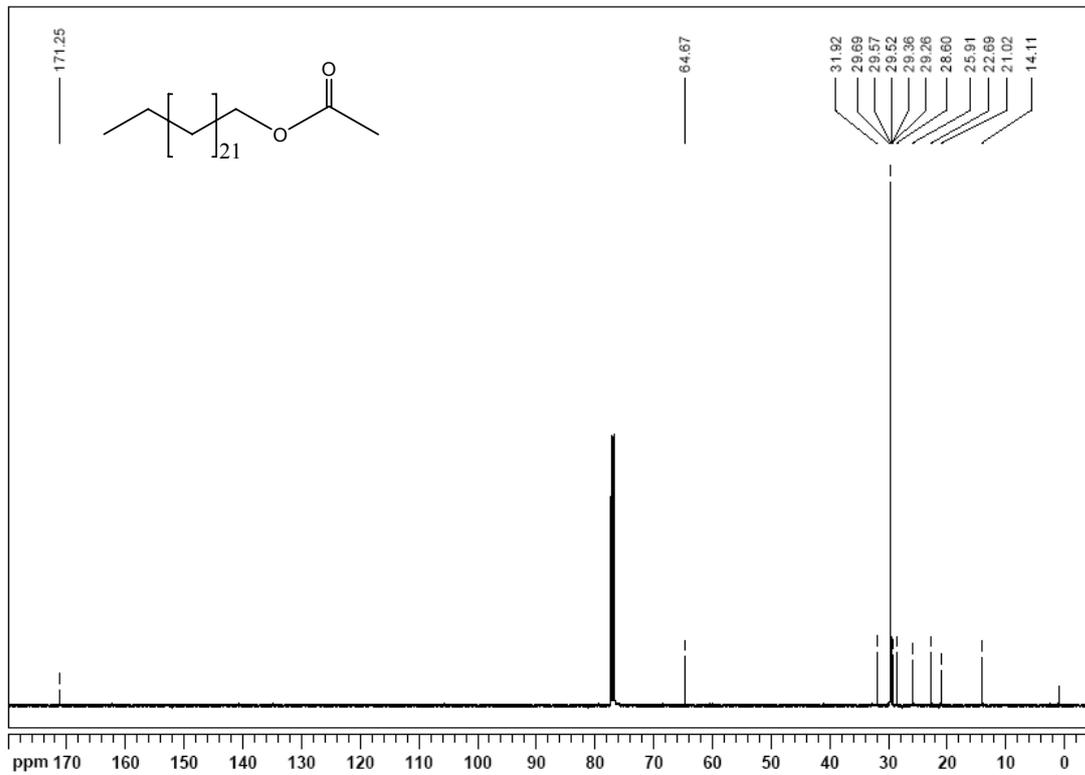


IR

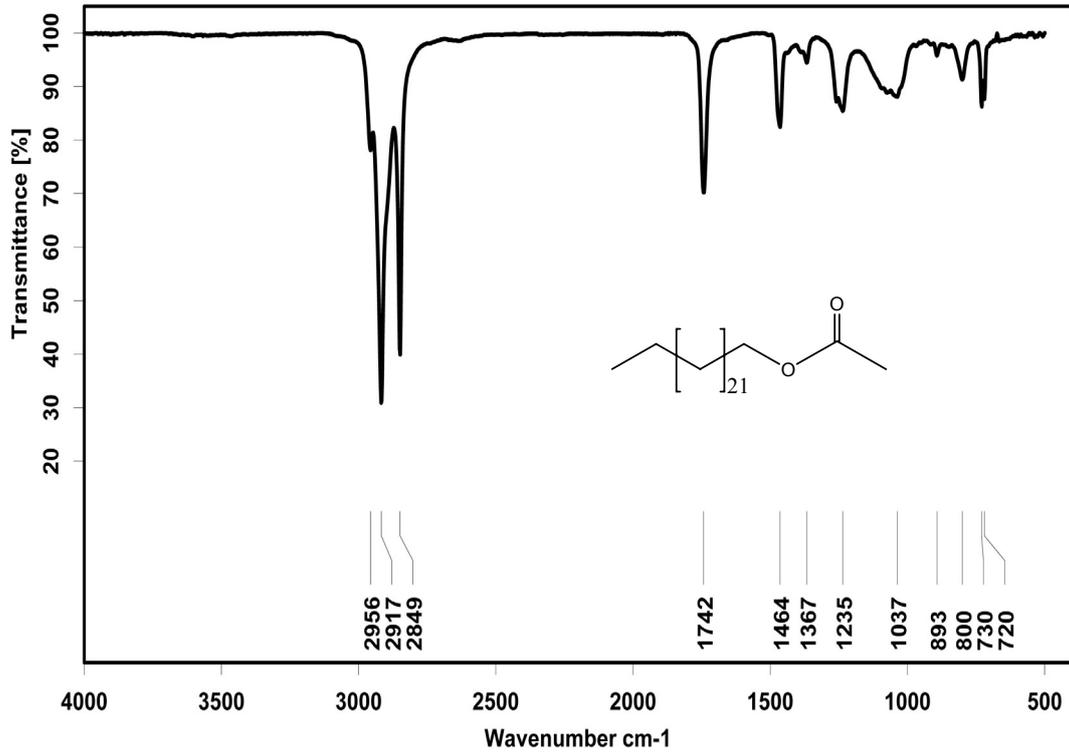


EI-MS

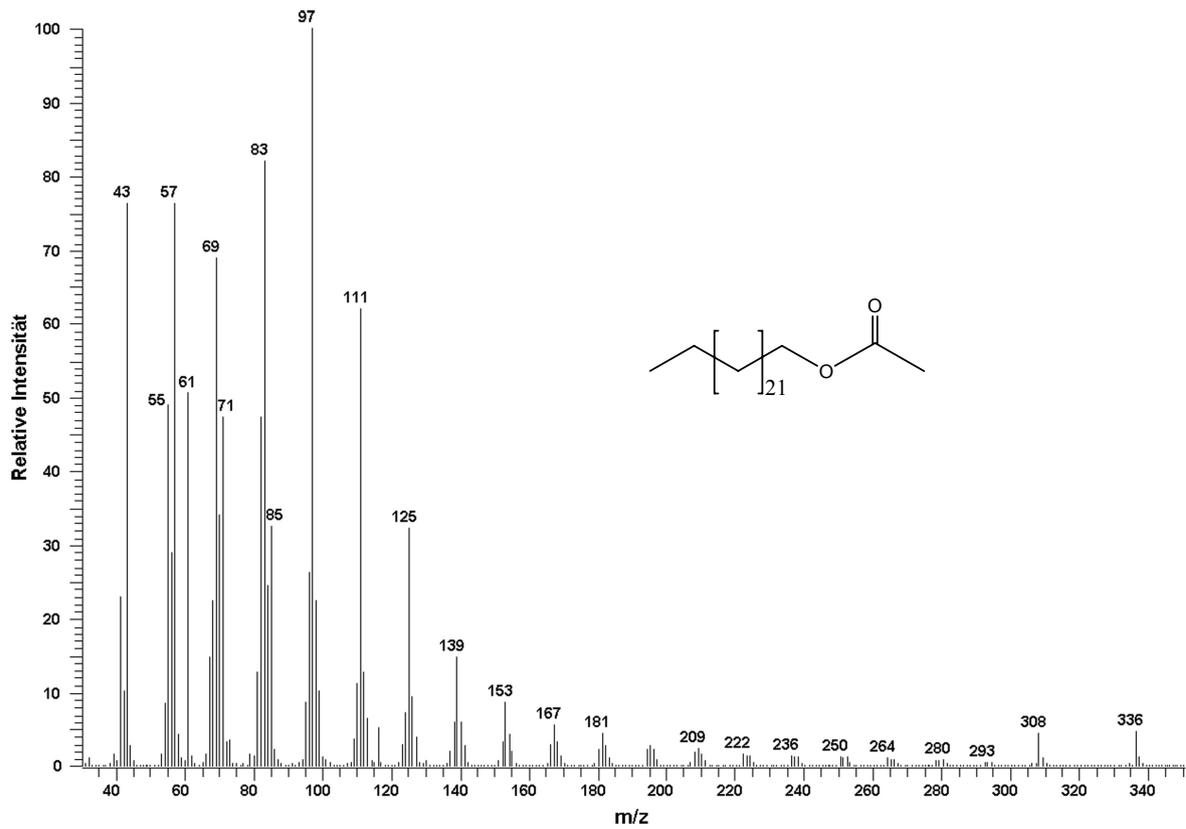


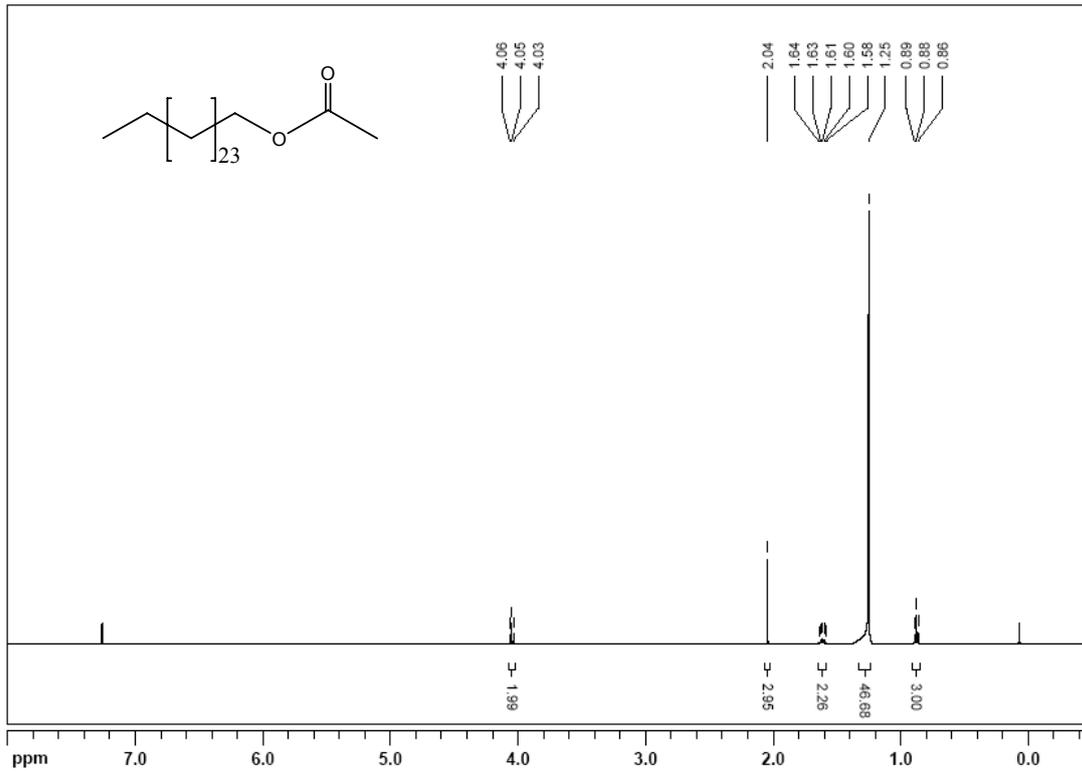
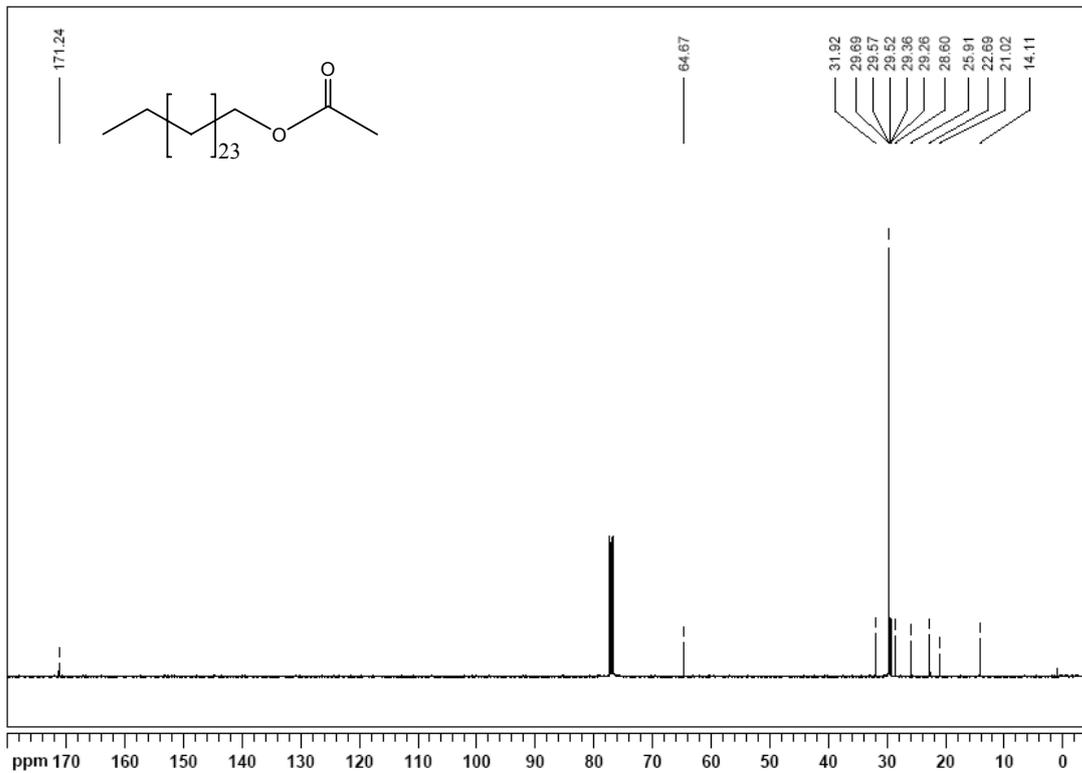
Tetracosylacetat (3)**¹H-NMR****¹³C-NMR**

IR

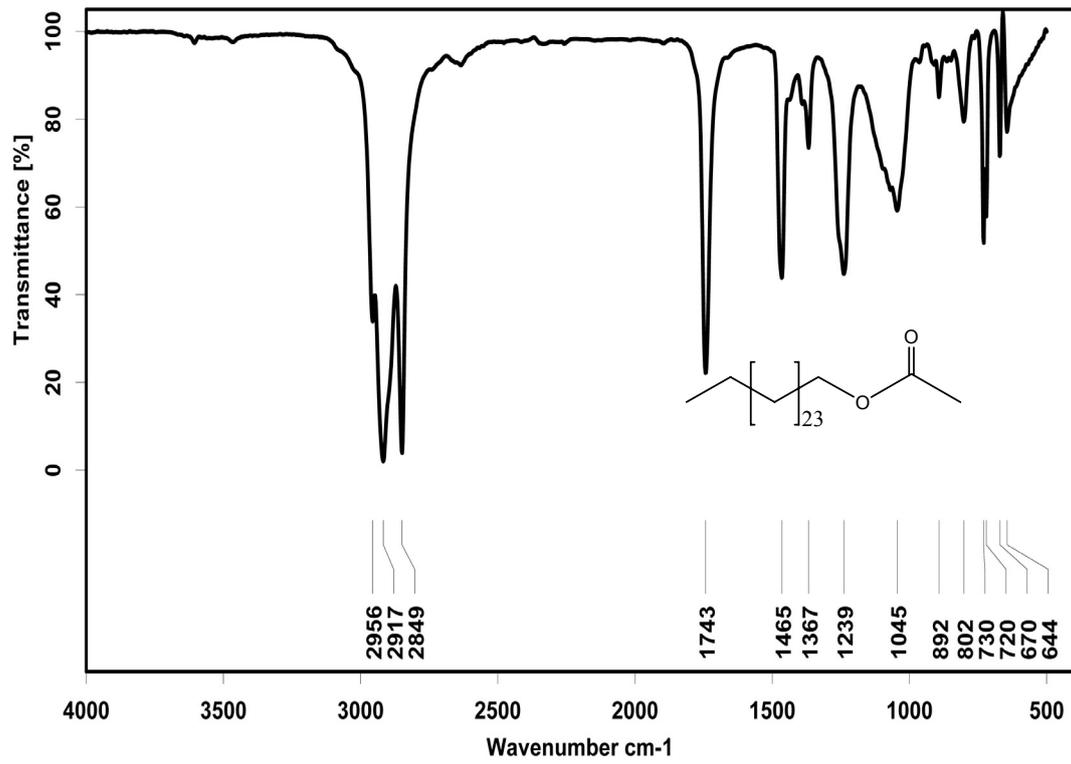


EI-MS

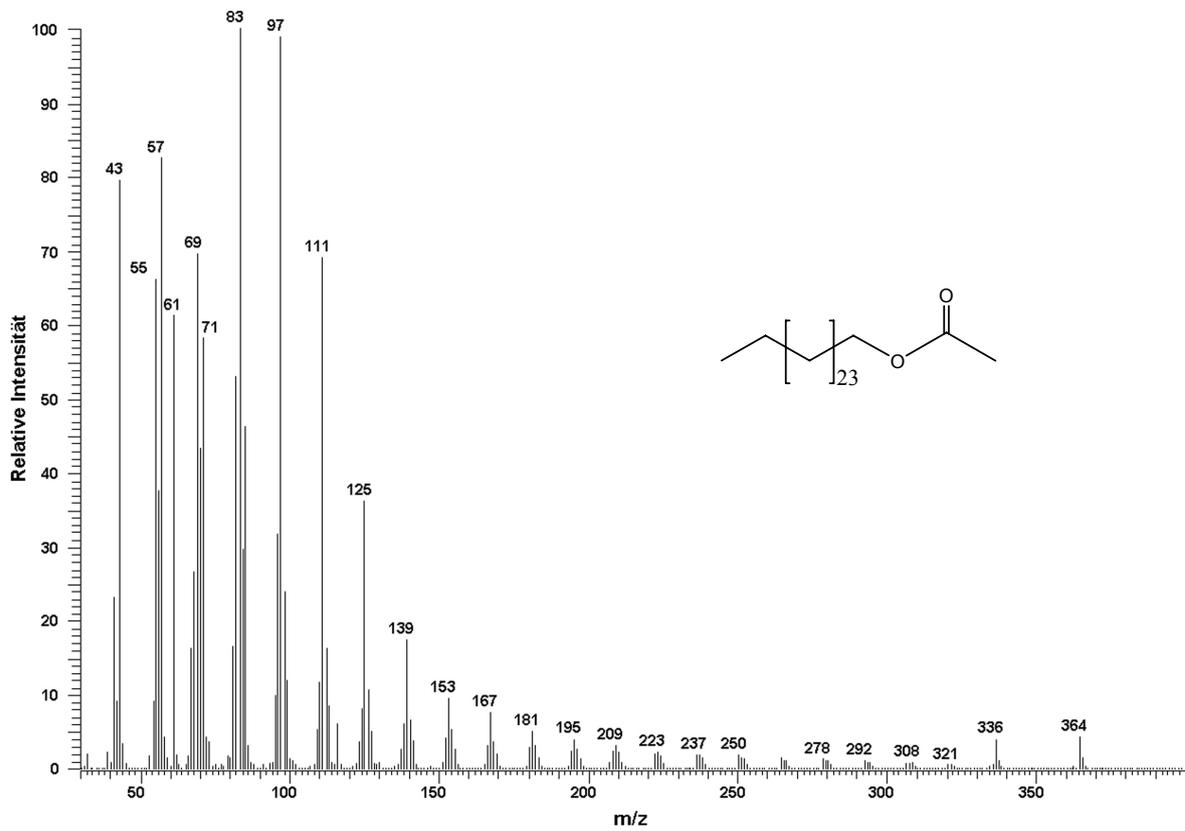


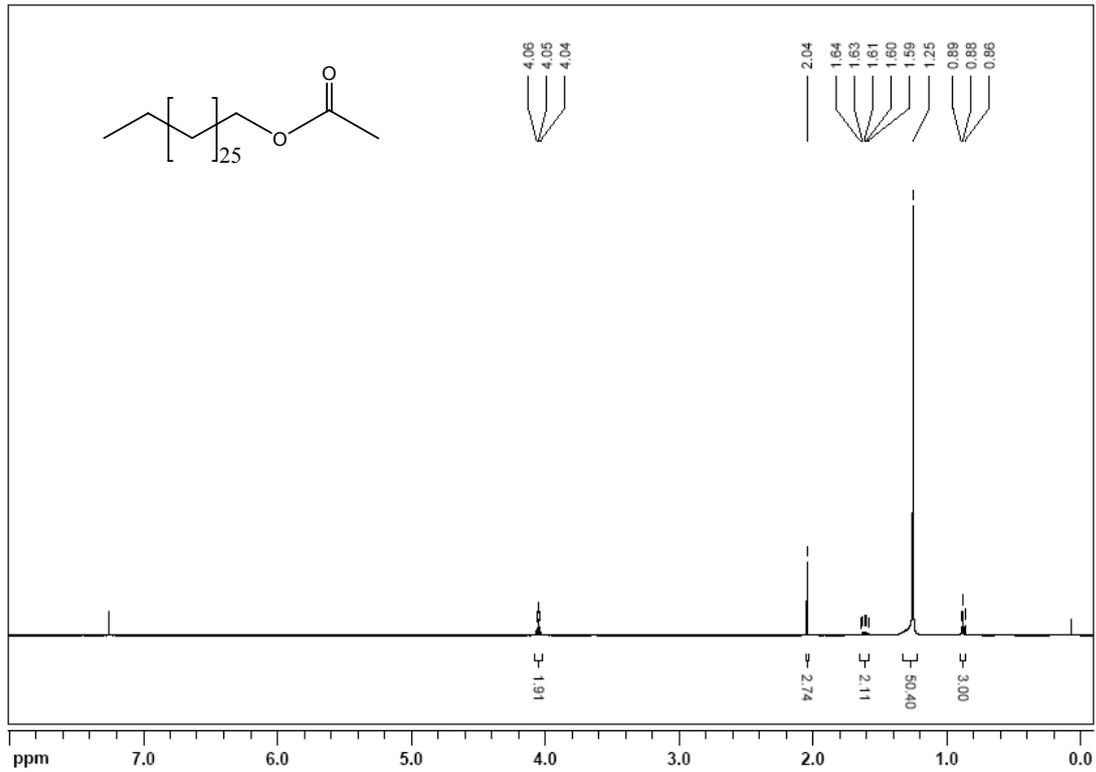
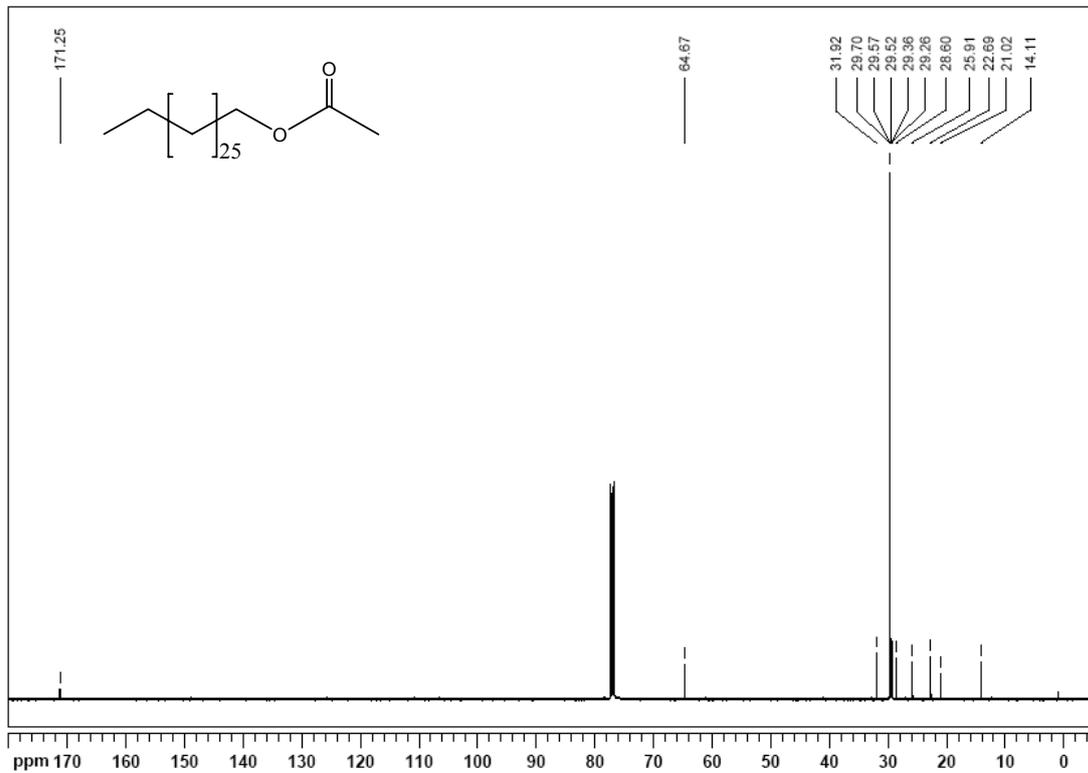
Hexacosylacetat (4)**¹H-NMR****¹³C-NMR**

IR

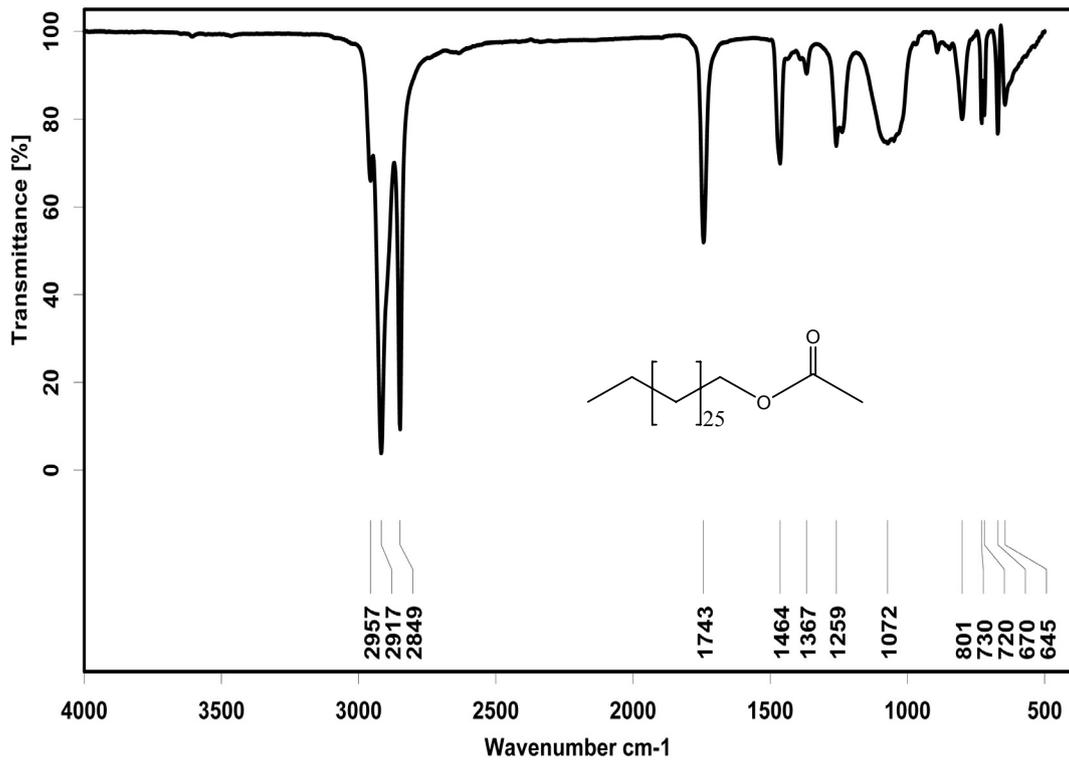


EI-MS

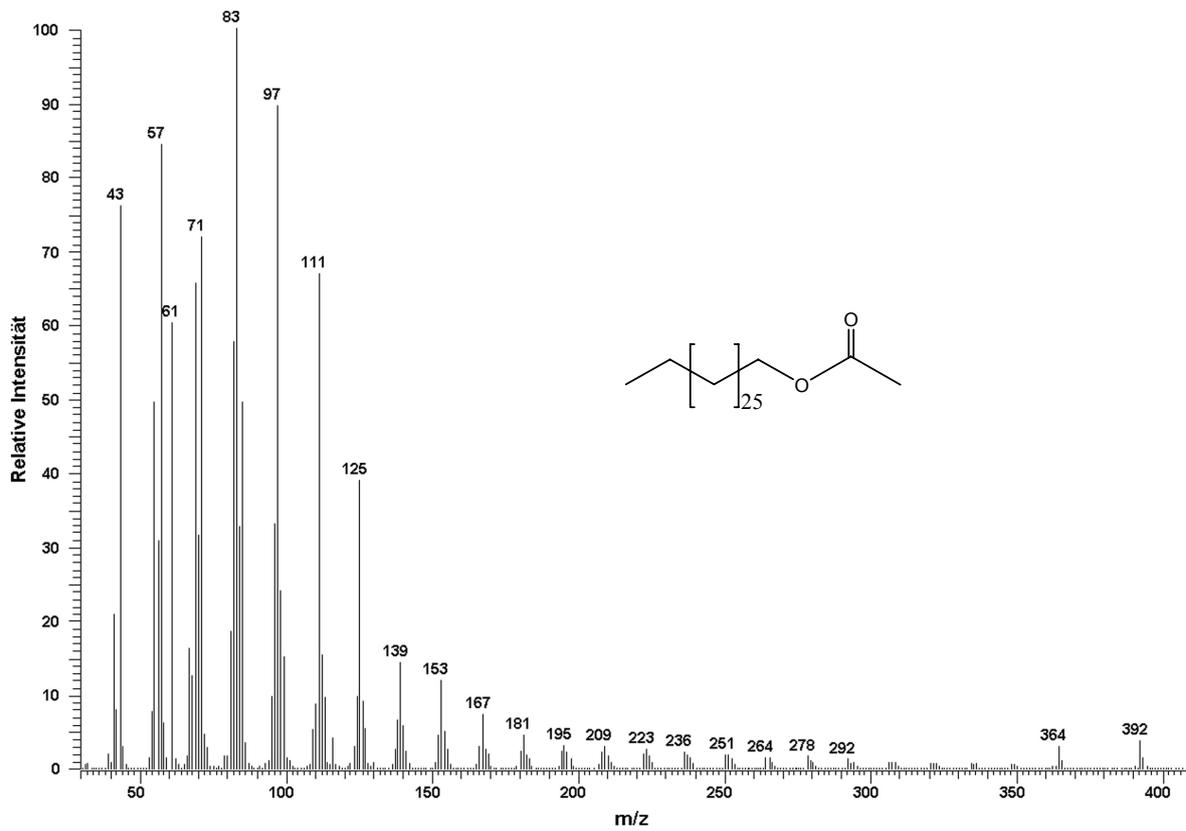


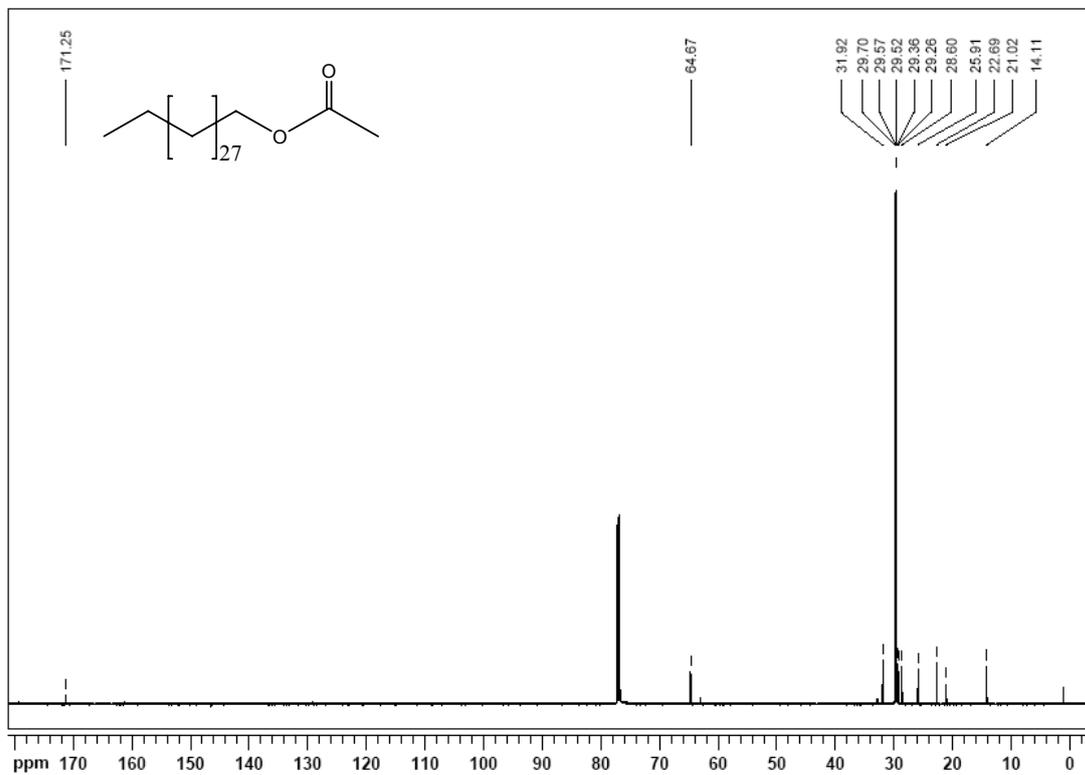
Octacosylacetat (5)**¹H-NMR****¹³C-NMR**

IR



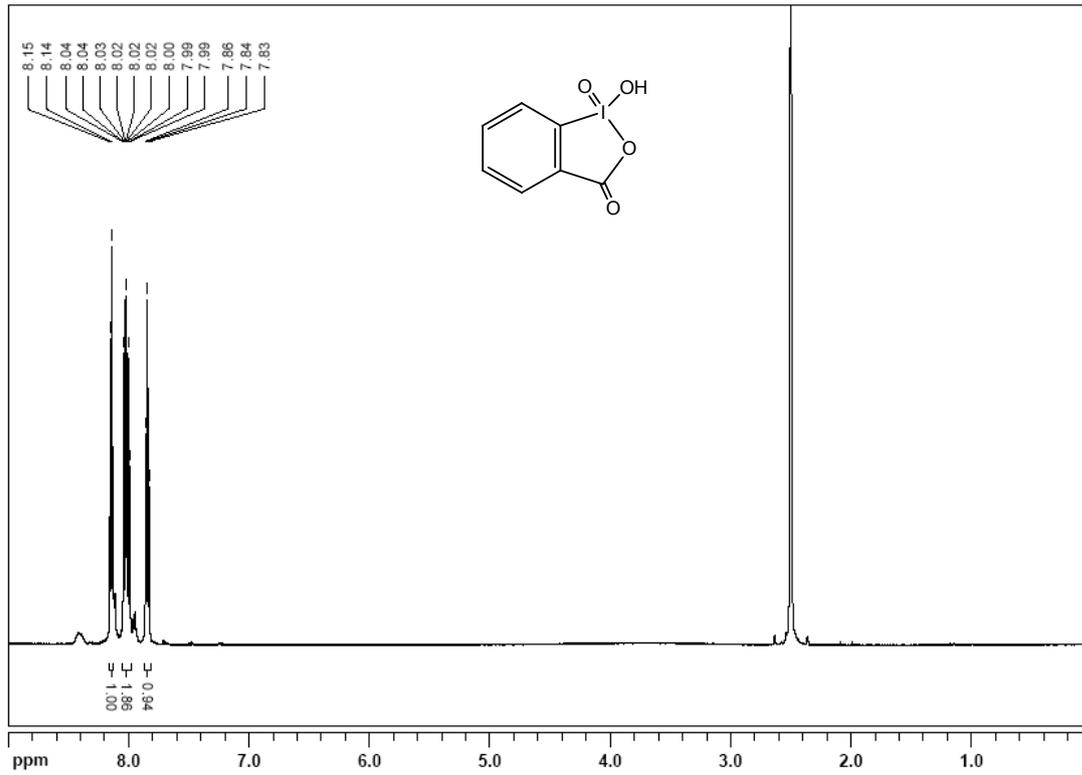
EI-MS



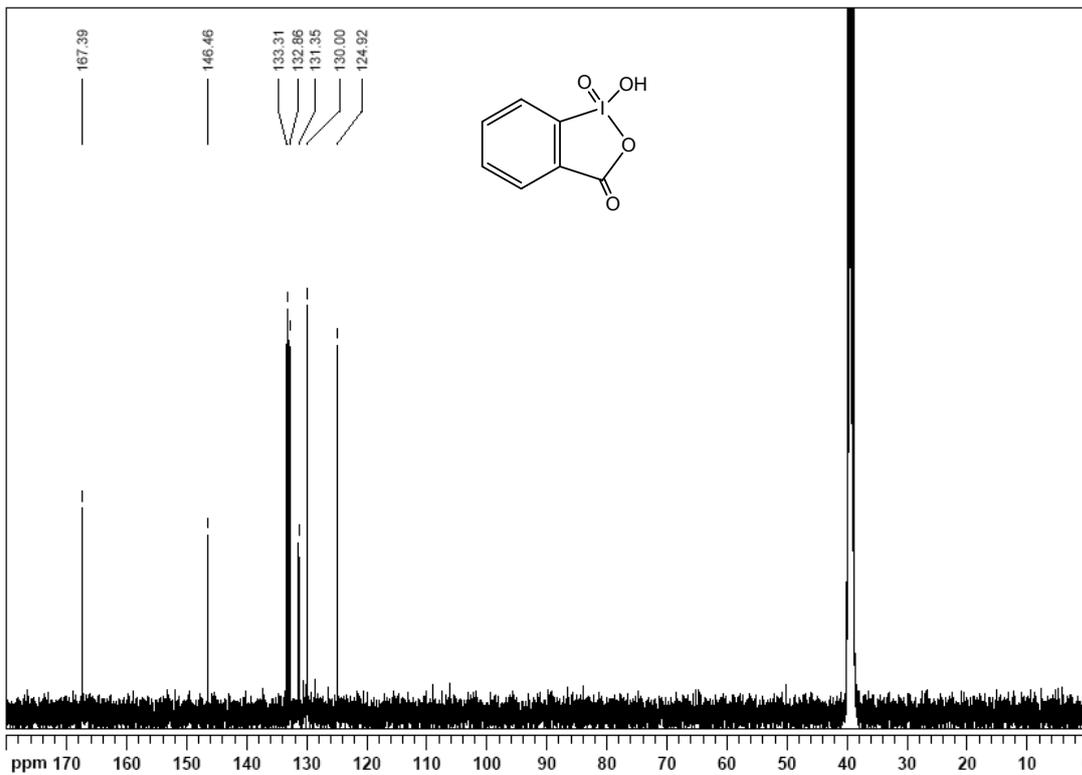
Triacontanylacetat (6) **$^1\text{H-NMR}$**  **$^{13}\text{C-NMR}$** 

2-Iodoxybenzoesäure (7)

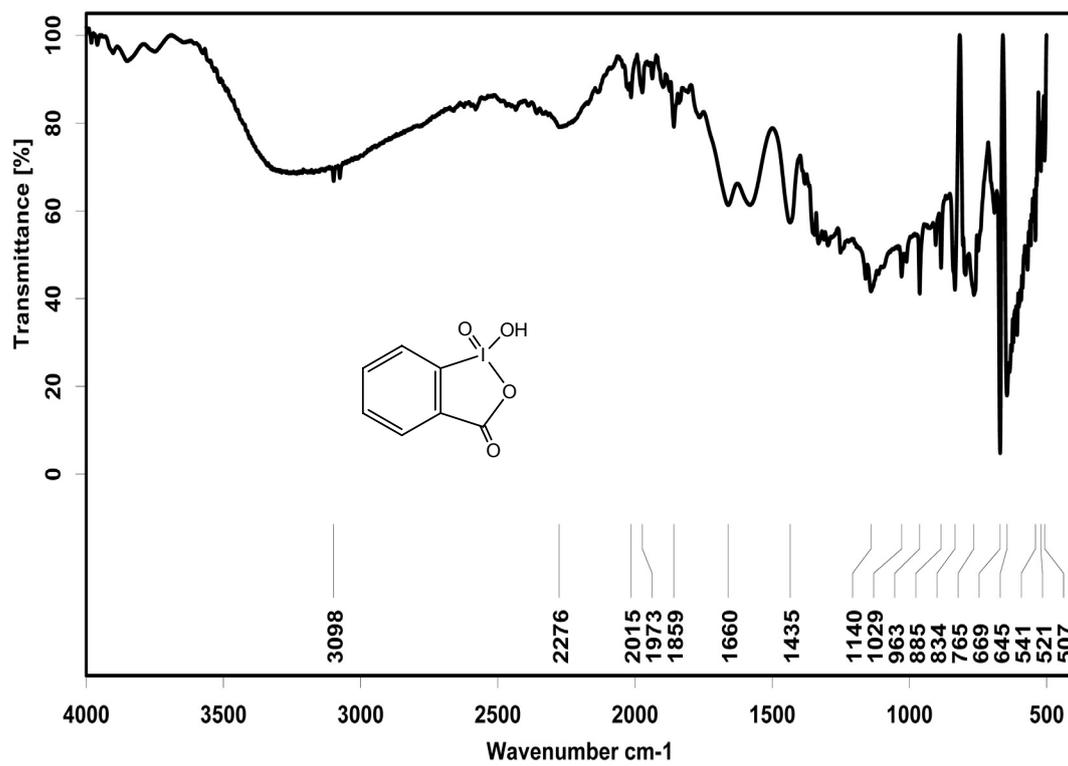
$^1\text{H-NMR}$

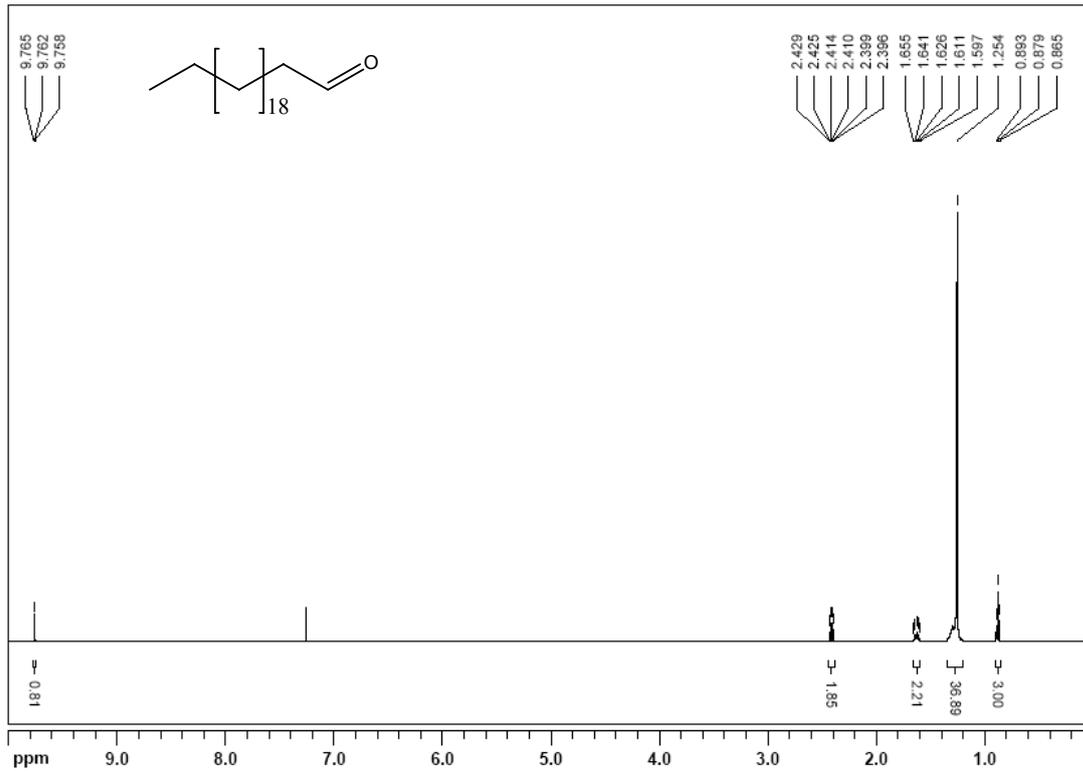
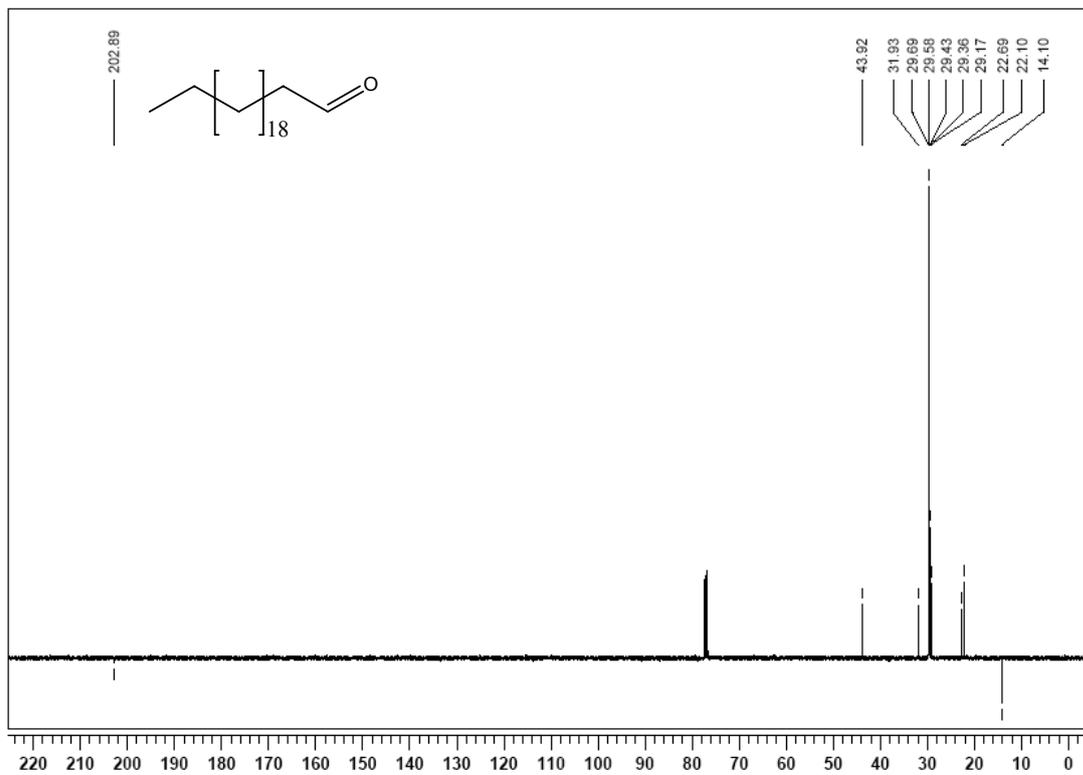


$^{13}\text{C-NMR}$

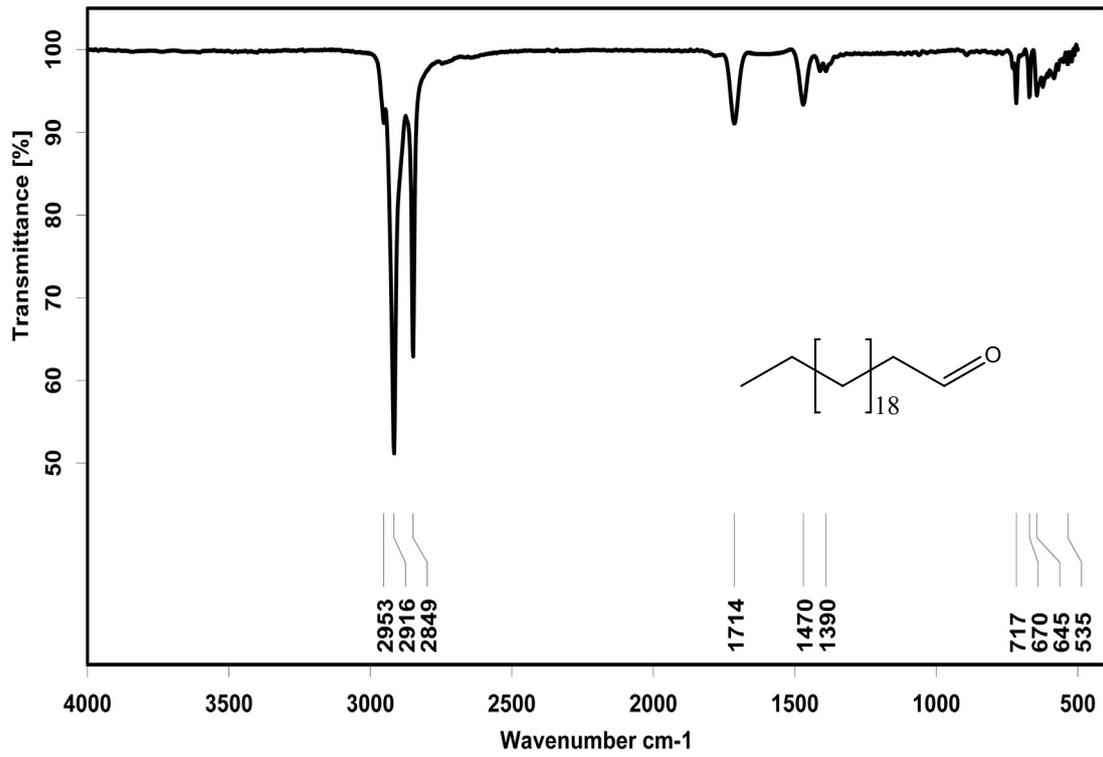


IR

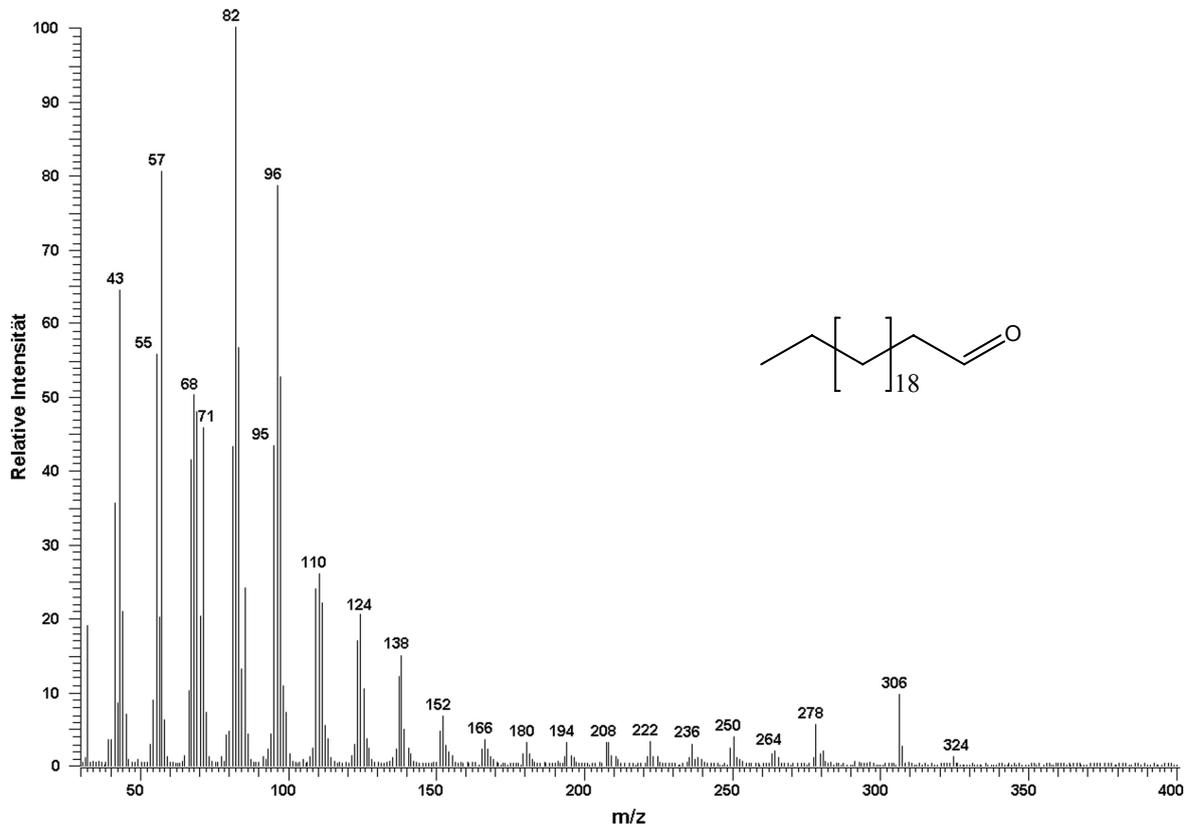


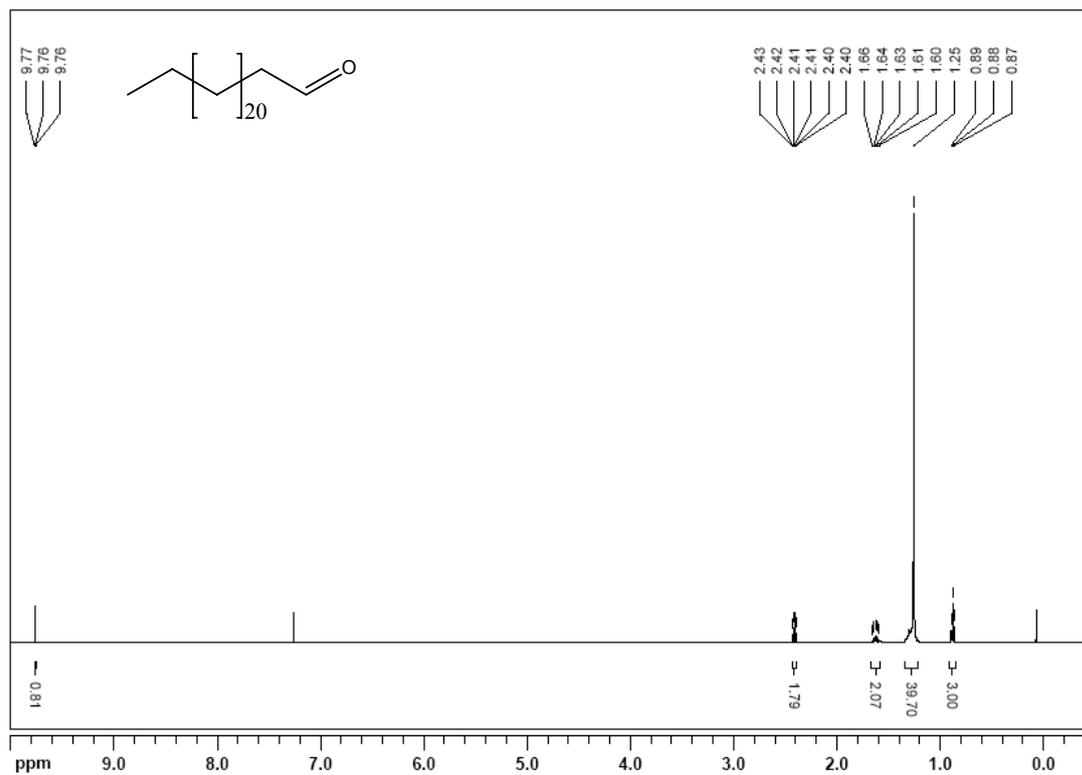
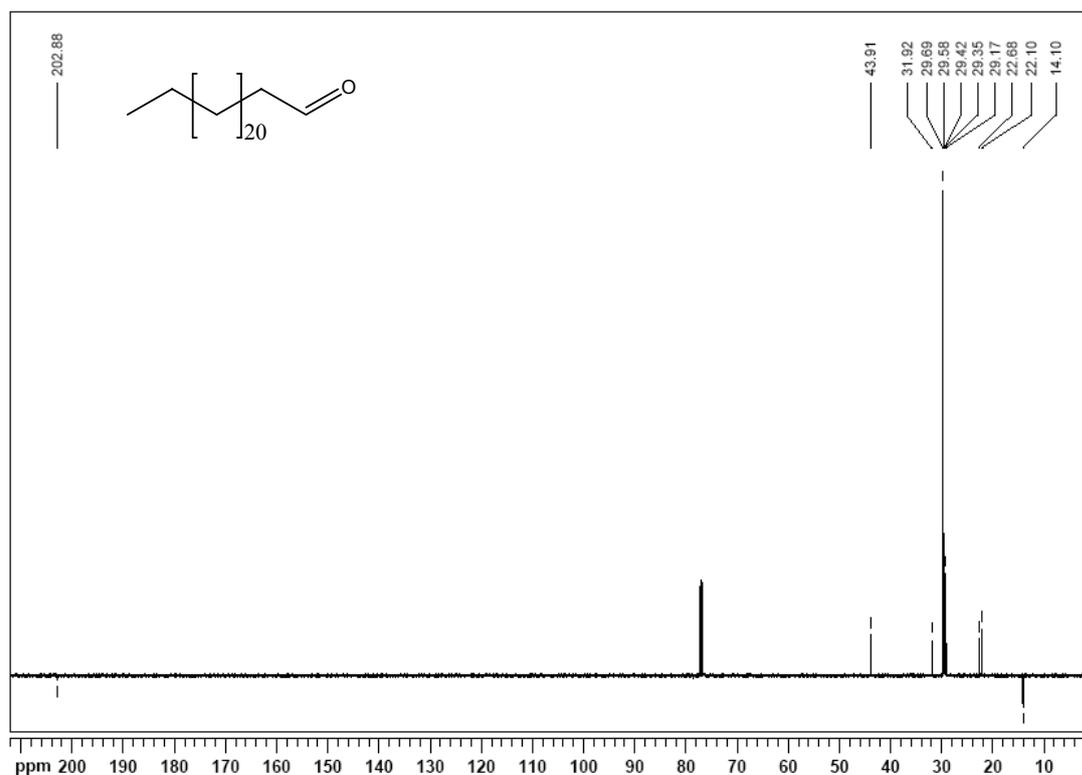
Docosanal (8)**¹H-NMR****¹³C-NMR**

IR

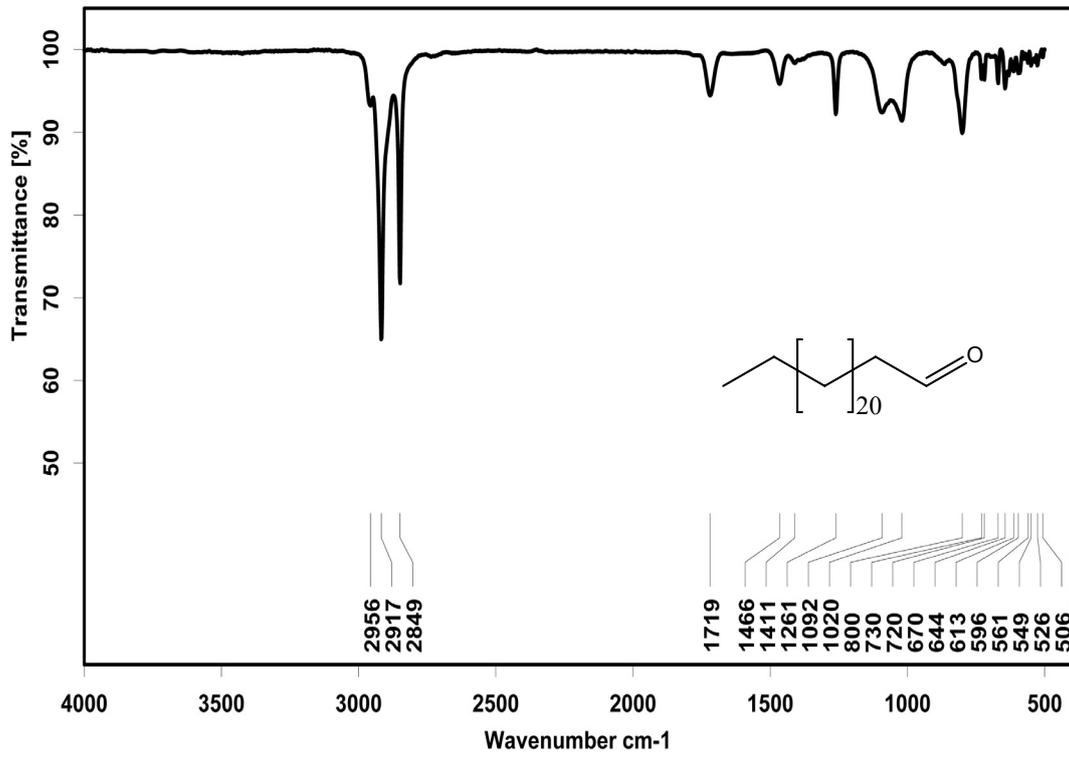


EI-MS

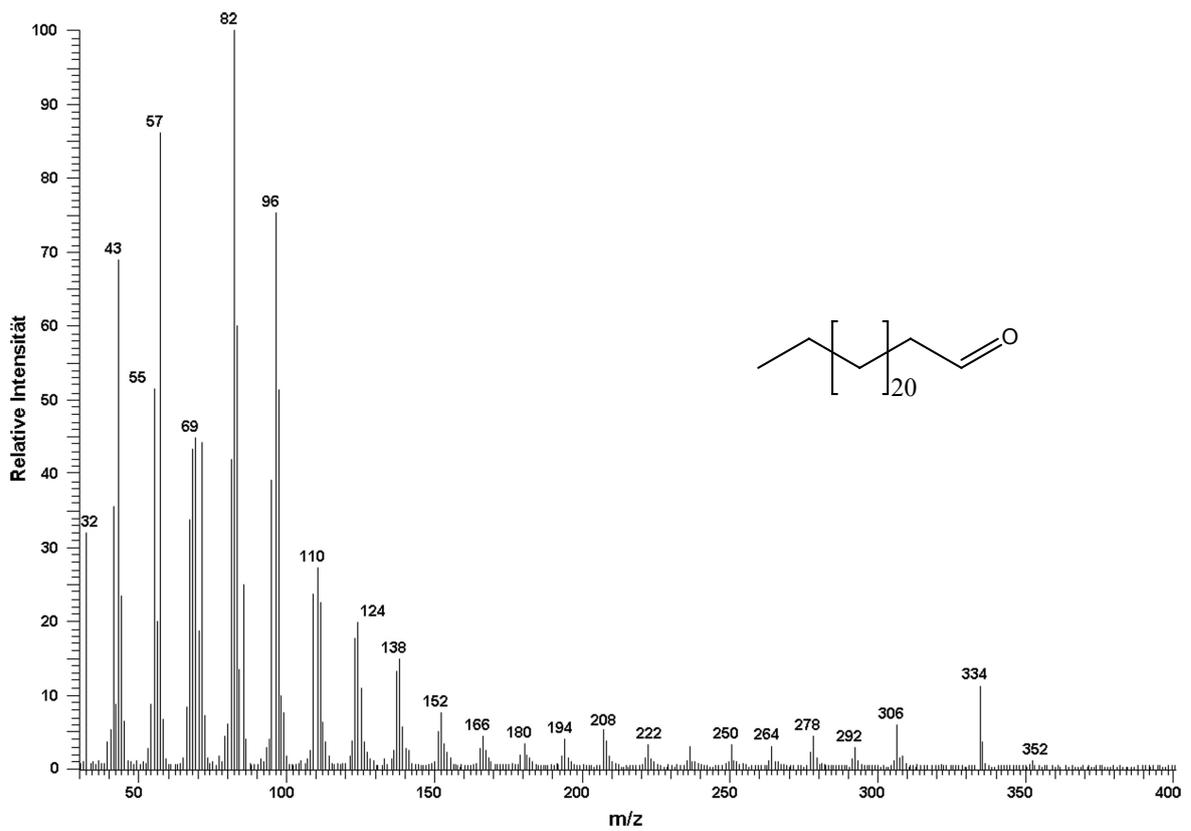


Tetracosanal (9) **$^1\text{H-NMR}$**  **$^{13}\text{C-NMR}$** 

IR

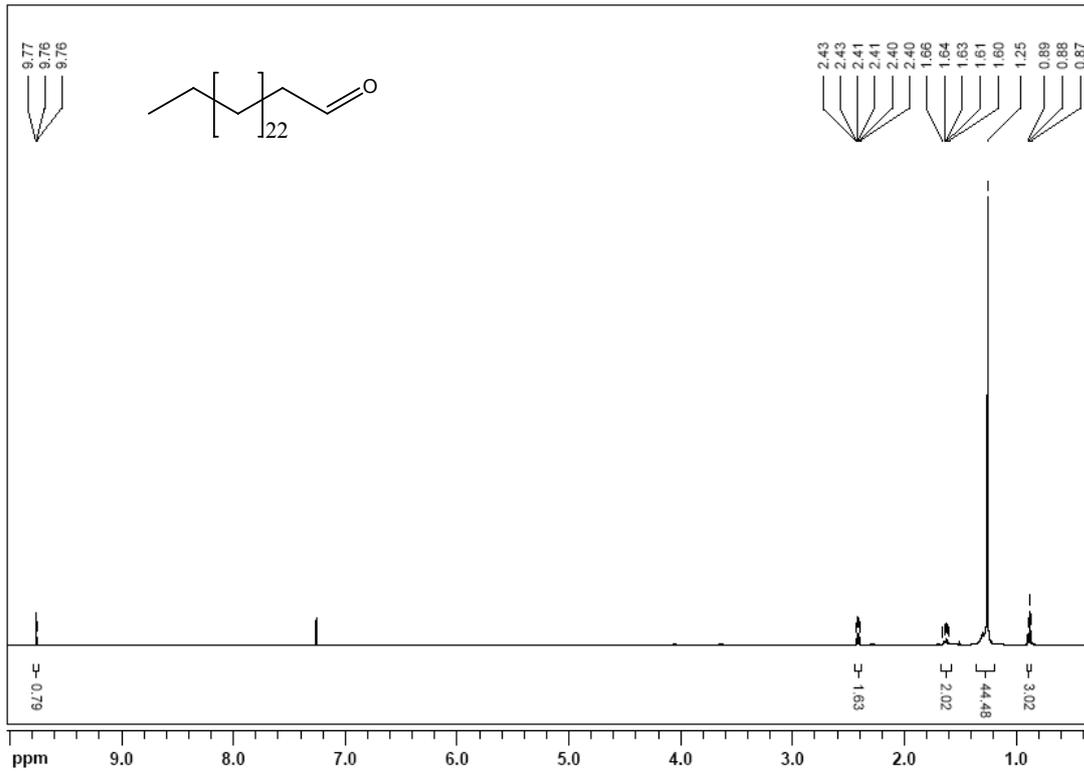


EI-MS

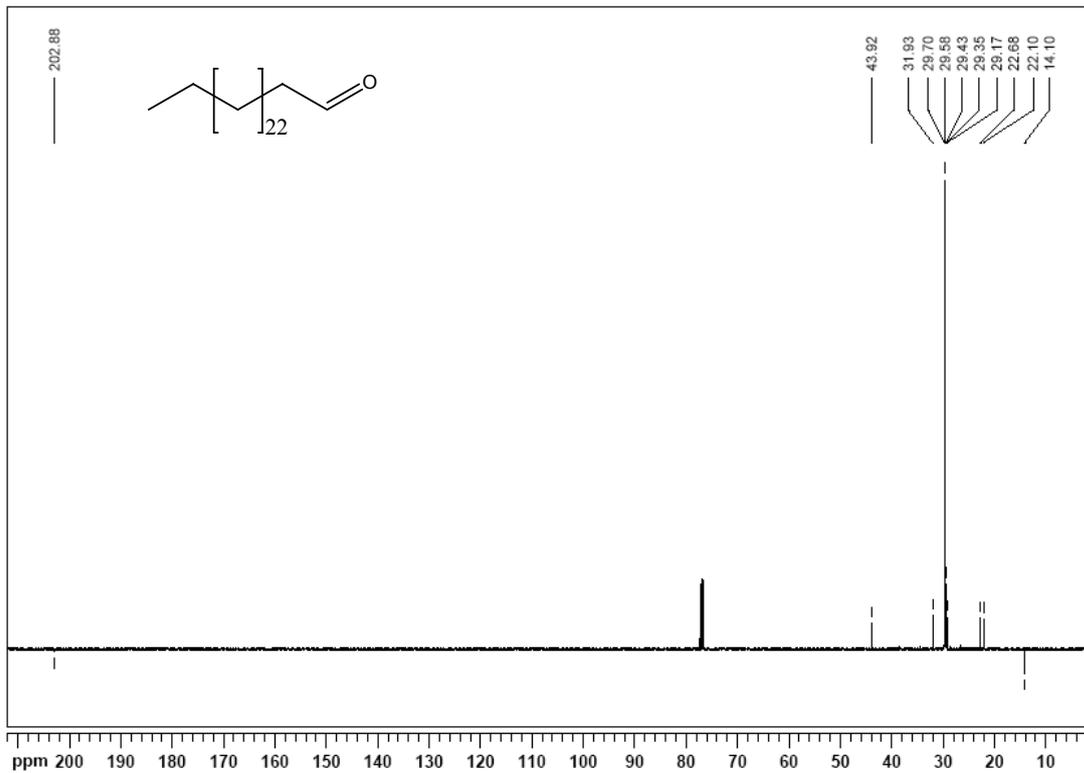


Hexacosanal (10)

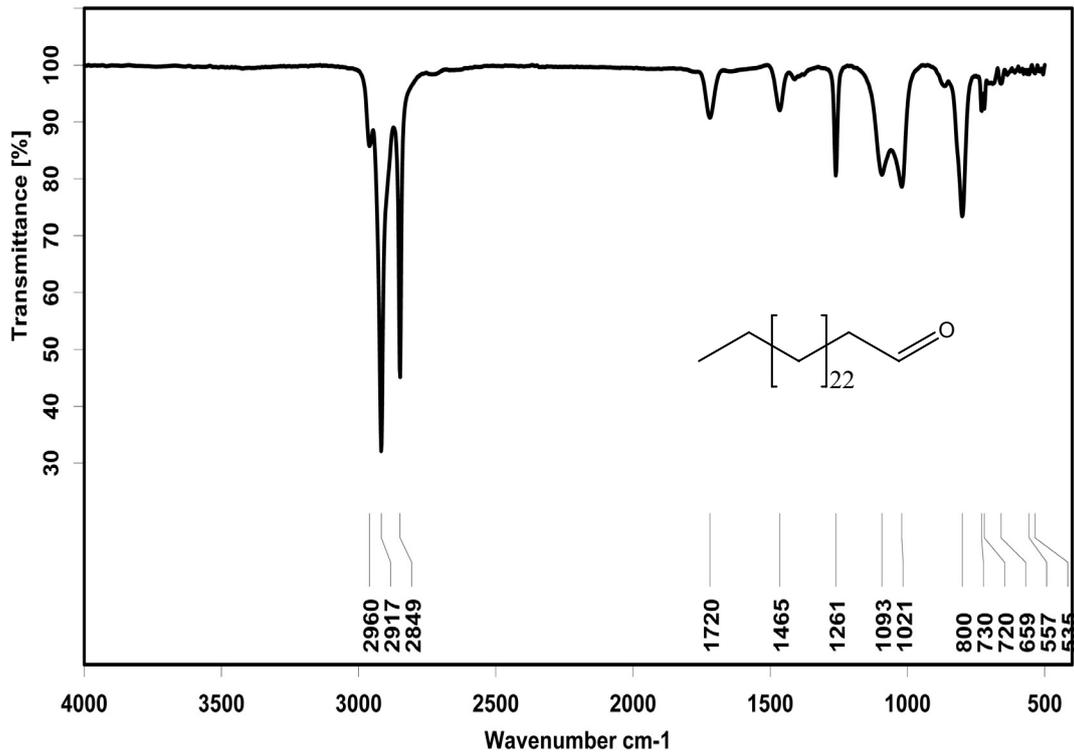
$^1\text{H-NMR}$



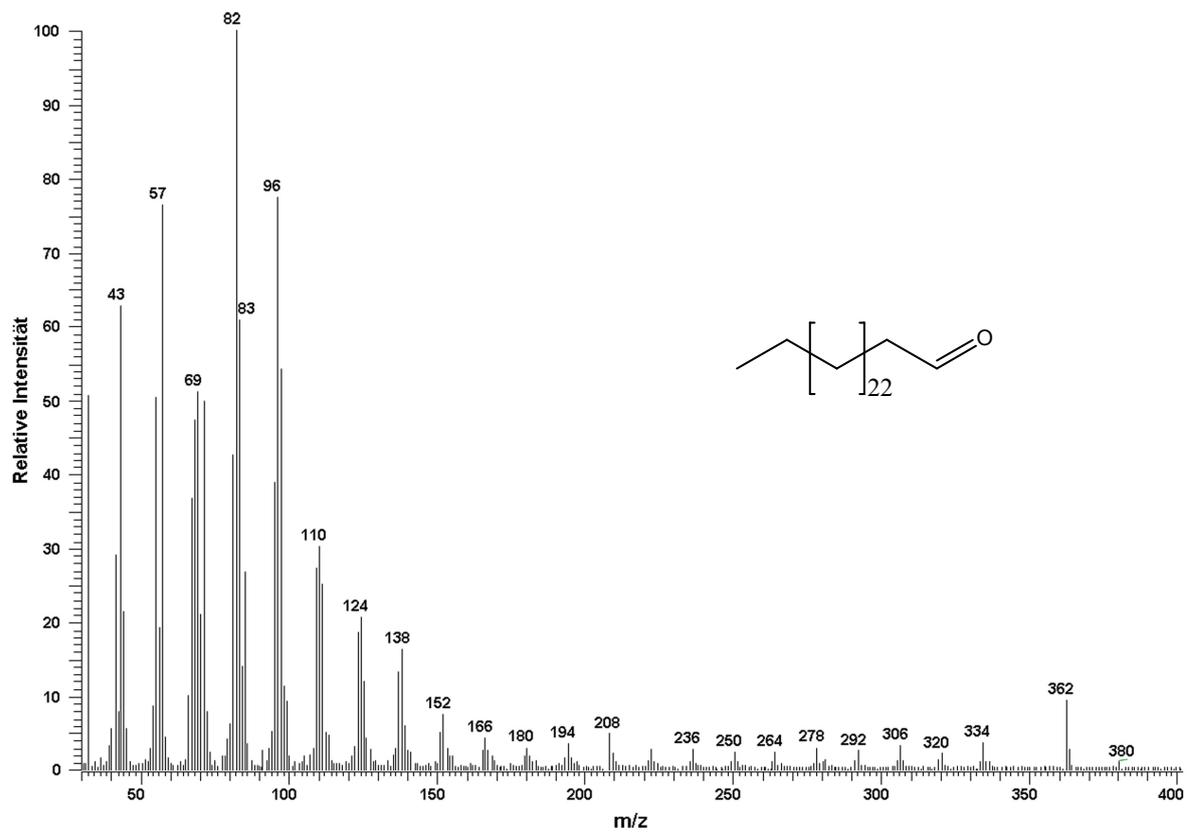
$^{13}\text{C-NMR}$

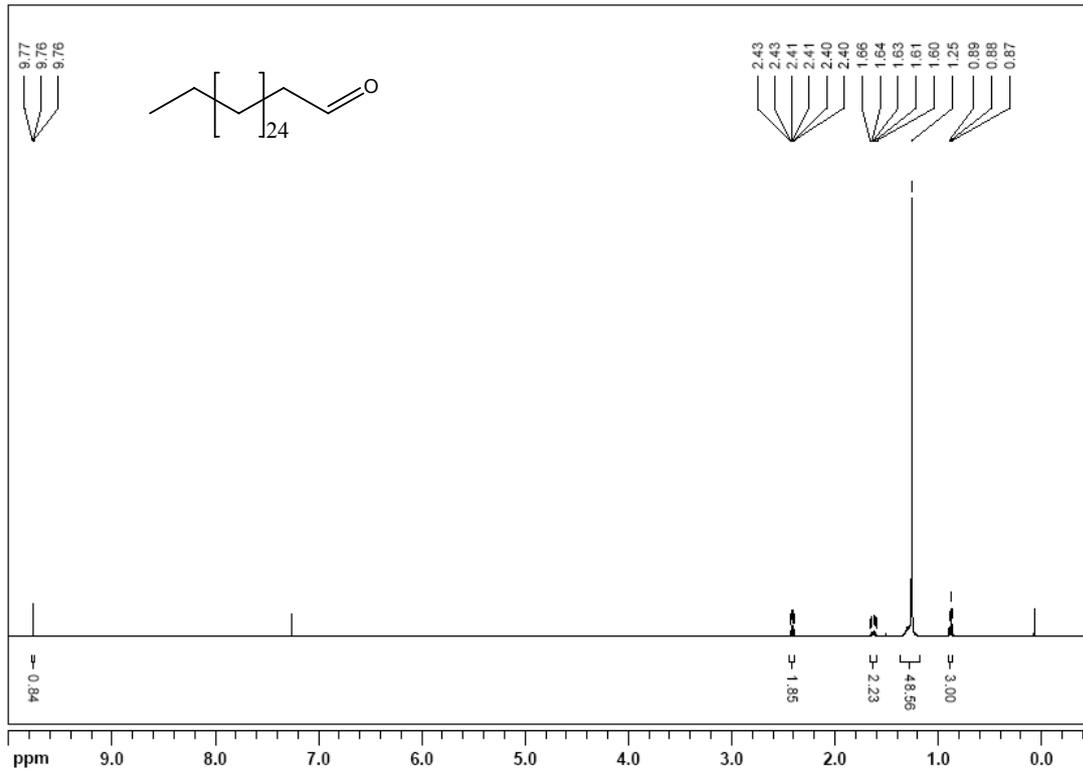


IR

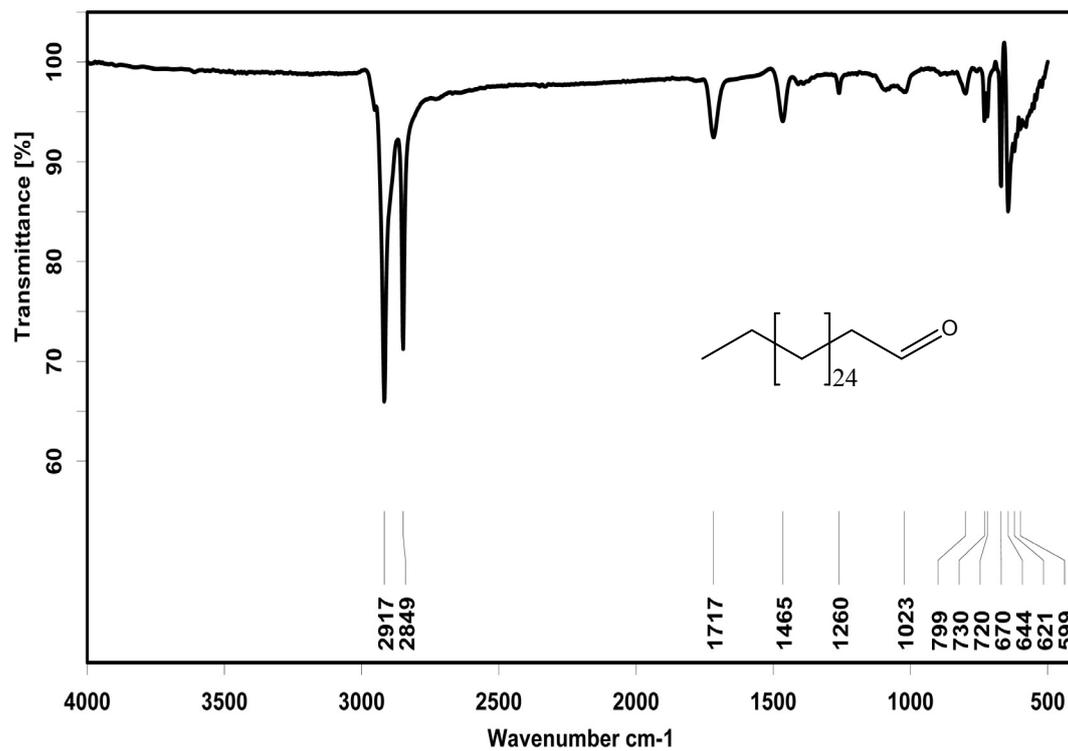


EI-MS

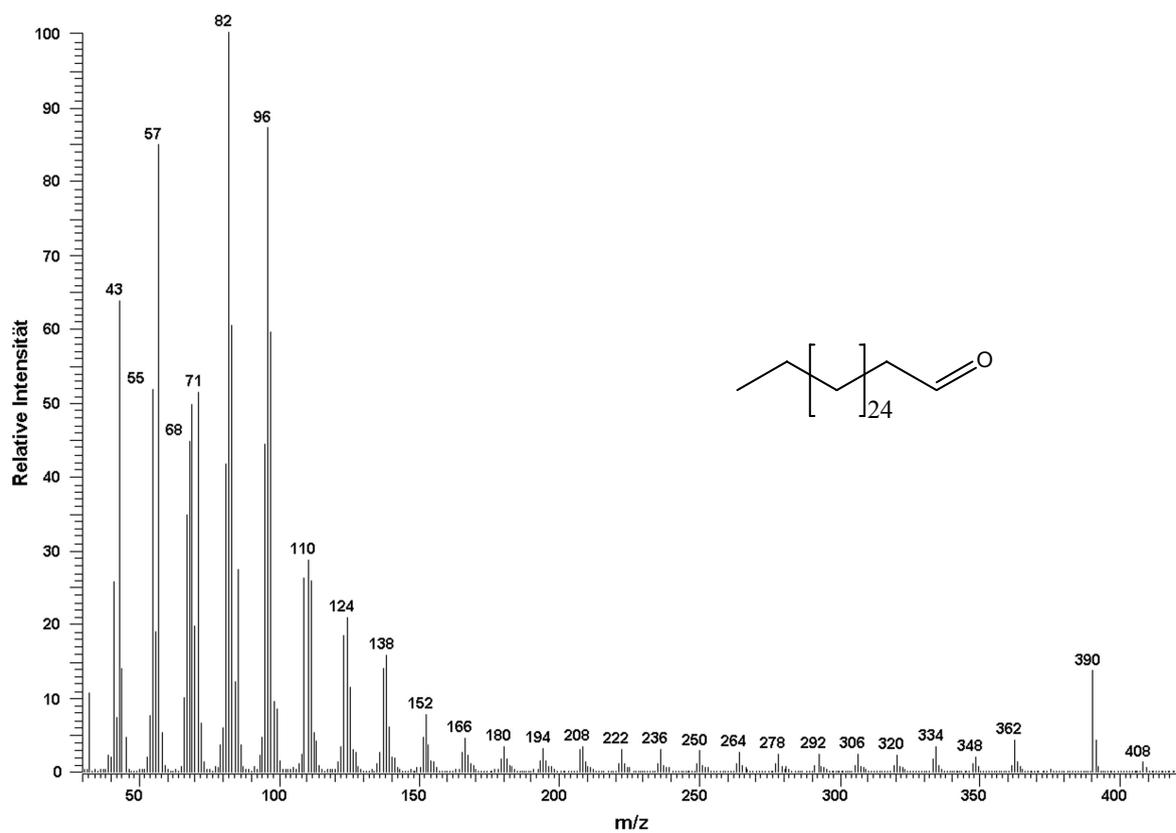


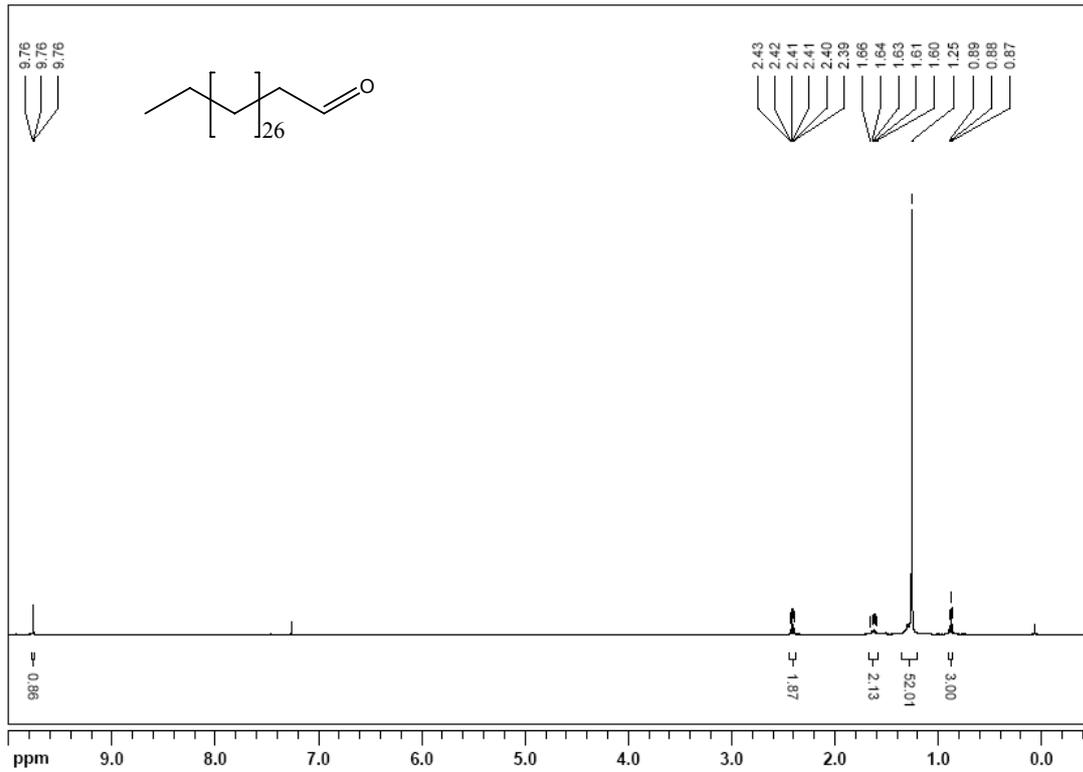
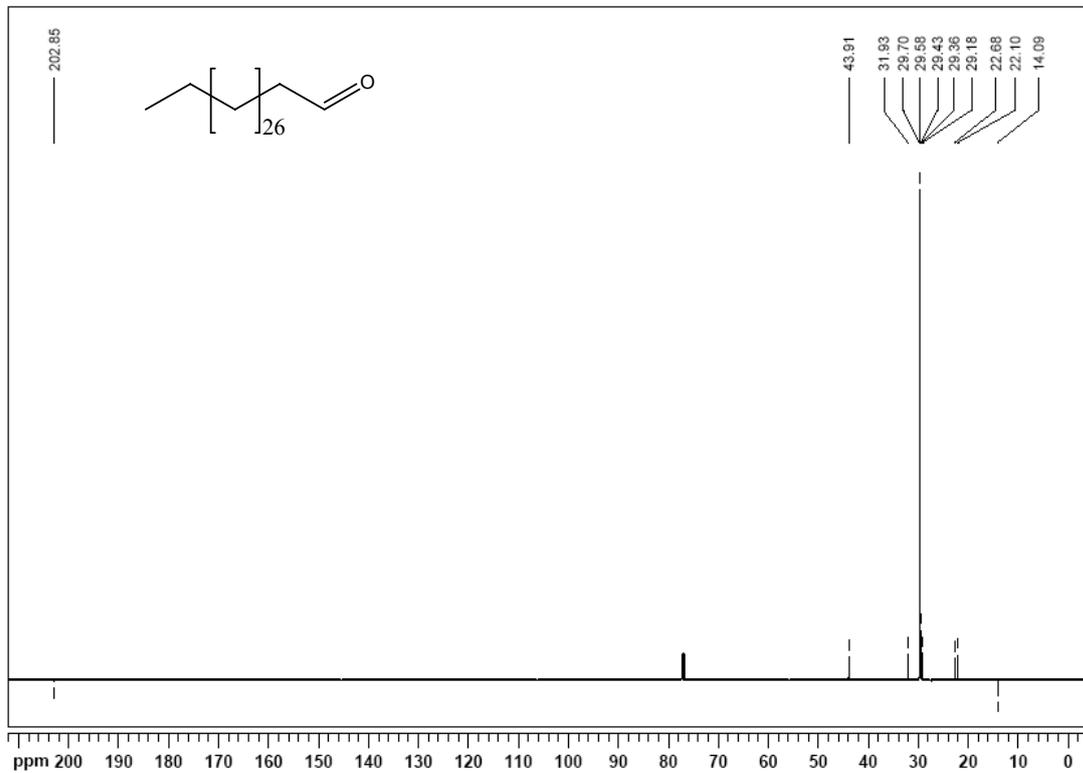
Octacosanal (11)**¹H-NMR****¹³C-NMR**

IR

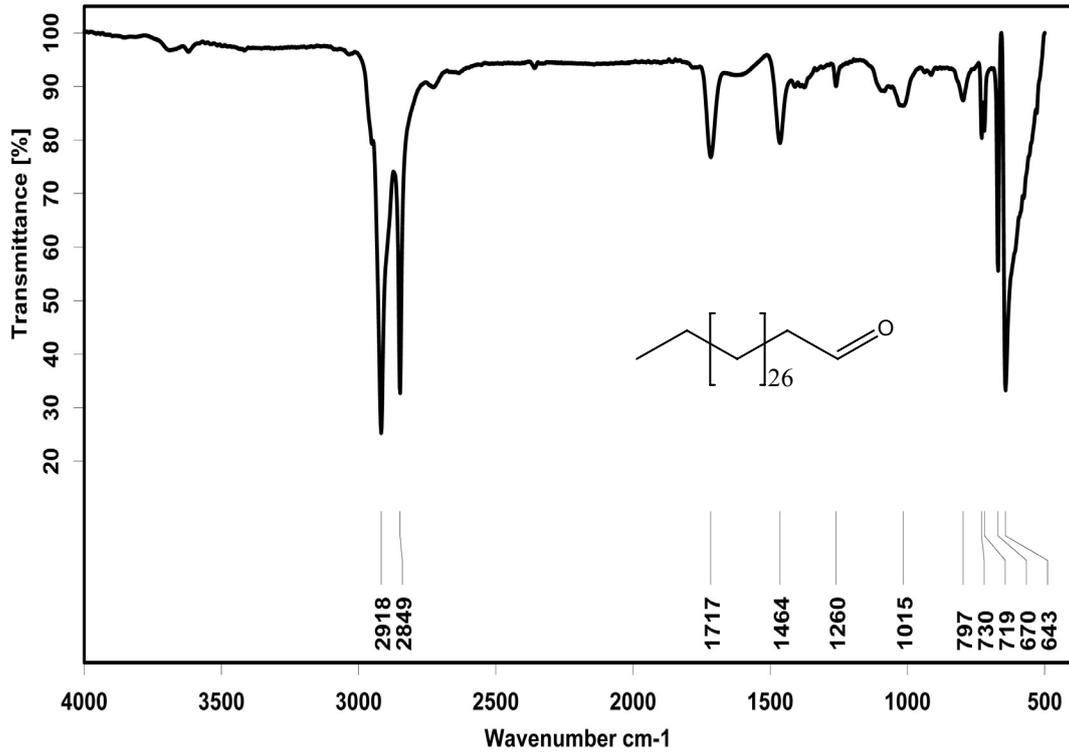


EI-MS

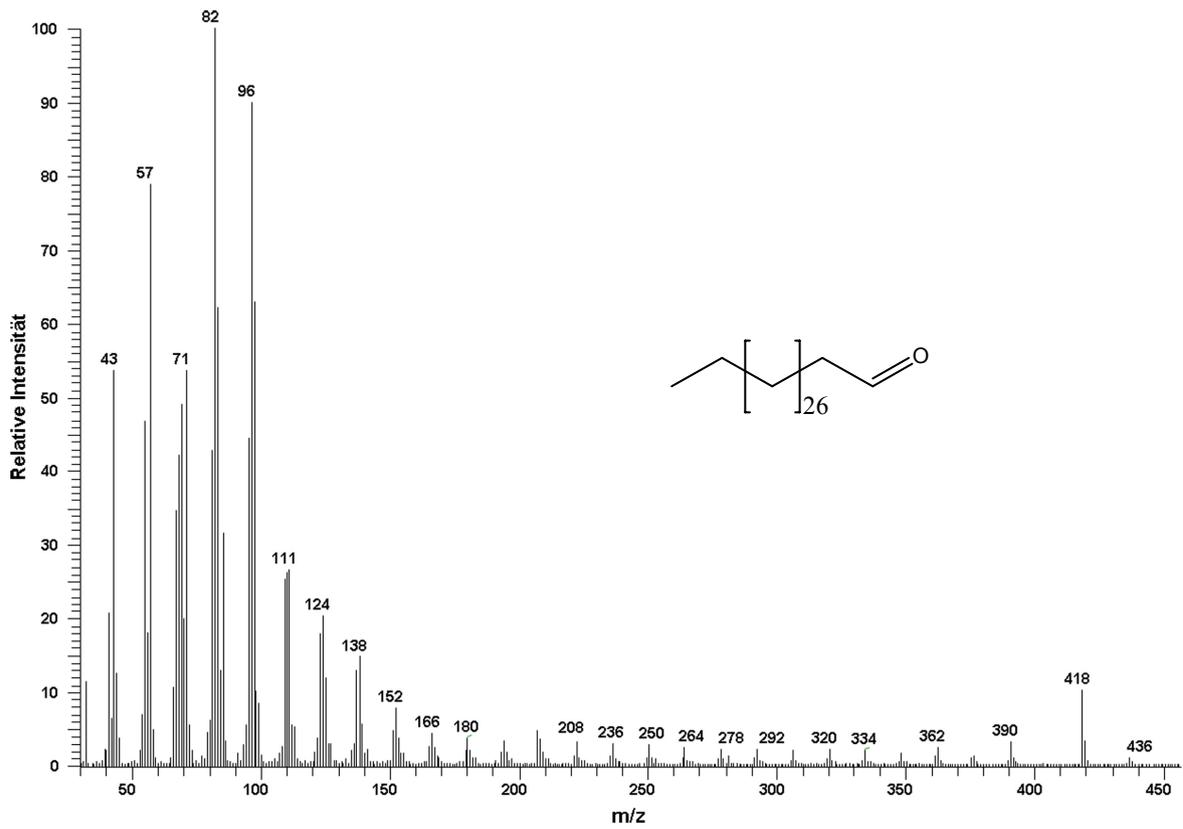


Triacontanal (12)**¹H-NMR****¹³C-NMR**

IR



EI-MS



9.2 LOD-Bestimmung der Referenzverbindungen für die MALDI-TOF-MS

9.2.1 LOD-Bestimmung der Einzelverbindungen

Versuchsnummer	c [mM]	OH	FS	CH	AE
1	10	33870	35300	17100	85000
2	10	28000	36400	18000	83000
3	10	37400	34500	18400	78000
4	10	35100	36600	17600	96000
Mittelwert		33593	35700	17775	85500
Standardabweichung		4005	983	556	7594
1	1,0	13870	10970	6410	23800
2	1,0	11000	9140	7100	27500
3	1,0	14300	10180	6940	20200
4	1,0	15100	9860	6360	28300
Mittelwert		13568	10038	6703	24950
Standardabweichung		1786	759	373	3724
1	0,5	7610	3910	2310	-
2	0,5	7050	4900	2510	-
3	0,5	6356	4230	2240	-
4	0,5	7460	5300	2310	-
Mittelwert		7119	4585	2343	-
Standardabweichung		561	630	116	-
1	0,2	3803	1240	1670	-
2	0,2	4253	1933	1550	-
3	0,2	2288	2230	1510	-
4	0,2	3437	1830	1640	-
Mittelwert		3445	1808	1577	-
Standardabweichung		841	415	75	-
1	0,1	1894	1051	522	9600
2	0,1	1830	1365	572	8600
3	0,1	1759	975	658	9300
4	0,1	1958	1298	799	9400
Mittelwert		1860	1172	638	9225
Standardabweichung		85	188	121	435

Versuchsnummer	c [mM]	OH	FS	CH	AE
1	0,05	-	-	-	5055
2	0,05	-	-	-	6570
3	0,05	-	-	-	9600
4	0,05	-	-	-	5930
Mittelwert		-	-	-	6789
Standardabweichung		-	-	-	1974
1	0,02	-	-	-	1940
2	0,02	-	-	-	2055
3	0,02	-	-	-	2687
4	0,02	-	-	-	1740
Mittelwert		-	-	-	2106
Standardabweichung		-	-	-	409
1	0,01	98	136	-	455
2	0,01	176	180	-	264
3	0,01	85	98	-	200
4	0,01	140	77	-	369
Mittelwert		125	123	-	322
Standardabweichung		415	45	-	113
Korrelationskoeffizient		0,9554	0,9848	0,9673	0,9835

Tab. 16: Relative Intensitäten, Mittelwerte und Standardabweichungen für die LOD-Bestimmung der Einzelverbindungen Hexacosanol (OH), Hexacosansäure (FS), Tetracosan (CH) und Eicosansäureeicosylester (AE).

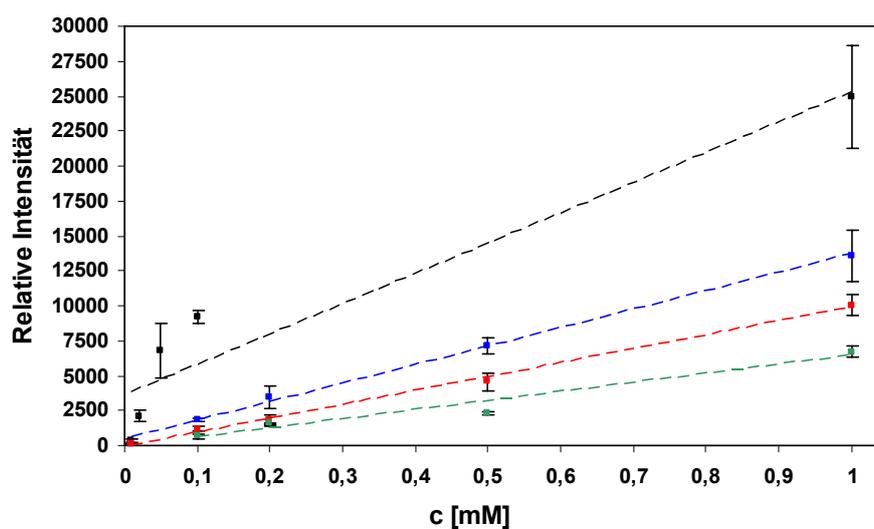


Abb. 46: Relative Intensitäten der ^7Li -Adduktionen und lineare Regression der Einzelreferenzen: Hexacosanol (blau), Hexacosansäure (rot), Tetracosan (grün) und Eicosansäureeicosylester (schwarz) im Konzentrationsbereich 1,00-0,01 mM.

9.2.2 LOD-Bestimmung des äquimolaren Referenzgemisches

Versuchsnummer	c [mM]	OH	FS	CH	AE
1	1	16300	11380	5880	33600
2	1	15800	12100	5400	29600
3	1	15400	13100	5790	30100
4	1	14000	13400	6430	32700
Mittelwert		15375	12495	5875	31500
Standardabweichung		988	928	425	1951
1	0,5	8080	3870	3670	20600
2	0,5	9250	5840	4360	19600
3	0,5	8950	4360	3790	19100
4	0,5	8700	4410	3310	19700
Mittelwert		4883	4620	3783	19750
Standardabweichung		460	849	436	624
1	0,2	4950	1650	1736	11800
2	0,2	4280	2260	1750	13000
3	0,2	5400	2100	1940	9600
4	0,2	4900	2680	1740	12500
Mittelwert		4883	2173	1792	11725
Standardabweichung		460	426	99	1500
1	0,1	3430	1750	960	9100
2	0,1	3790	1670	820	8400
3	0,1	4160	1520	950	8300
4	0,1	4050	1810	854	6300
Mittelwert		3858	1688	896	8025
Standardabweichung		324	126	70	1204
1	0,05	1354	856	-	4950
2	0,05	1870	820	-	4670
3	0,05	1380	620	-	4440
4	0,05	1634	785	-	5050
Mittelwert		1560	770	--	4778
Standardabweichung		242	104		277

Versuchsnummer	c [mM]	OH	FS	CH	AE
1	0,02	849	316	-	1936
2	0,02	650	415	-	2070
3	0,02	592	212	-	2210
4	0,02	760	483	-	1940
Mittelwert		713	357	-	2039
Standardabweichung		114	118	-	130
1	0,01	196	125	-	478
2	0,01	129	97	-	362
3	0,01	128	131	-	200
4	0,01	131	112	-	359
Mittelwert		146	116	-	350
Standardabweichung		33	15	-	114
Korrelationskoeffizient		0,9875	0,9893	0,9896	0,9809

Tab. 17: Relative Intensitäten, Mittelwerte und Standardabweichungen für die LOD-Bestimmung des Referenzgemisches aus Hexacosanol (OH), Hexacosansäure (FS), Tetracosan (CH) und Eicosansäureeicosylester (AE).

9.3 Qualitative und quantitative Analyse der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers

Probenname	Auswaage [mg]	Oberflächenbedeckung [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
PL1	1,8	14,44
PL2	1,6	12,84
PL3	1,7	13,64
PL4	1,8	14,44
MW \pm SD	1,7 \pm 0,1	13,84 \pm 0,77

Tab. 18: Auswaagen und resultierende Oberflächenbedeckung der epikutikularen Wachse des Kirschlorbeers.

Kettenlänge	Retentionszeit [min]				
	Alkane	n-Alkohole	Fettsäuren	Aldehyde	Alkoholacetate
20	8,00 (int. Std.)	12,24	13,81	-	-
21	-	13,99	15,20	-	-
22	-	15,59	17,05	13,49.	-
23	11,51	17,15	18,70	-	-
24	13,05	18,85	20,31	16,82	20,14
25	14,63	20,47	21,91	-	-
26	16,30	22,04	23,47	20,14	23,02
27	17,94	23,60	24,96	-	-
28	19,58	25,12	26,49	23,36	26,10
29	21,24	26,66	28,40	-	-
30	22,79	28,03	29,41	26,48	29,04
31	24,38	29,65	-	-	-
32	25,86	30,82	32,09.	-	31,78
33	27,34	-	-	-	-

Tab. 19: Retentionszeiten der Alkane, primären Alkohole, Fettsäuren, Aldehyde und Acetate im unbehandelten epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (GC-MS-Systems I, ZB-5ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_2).

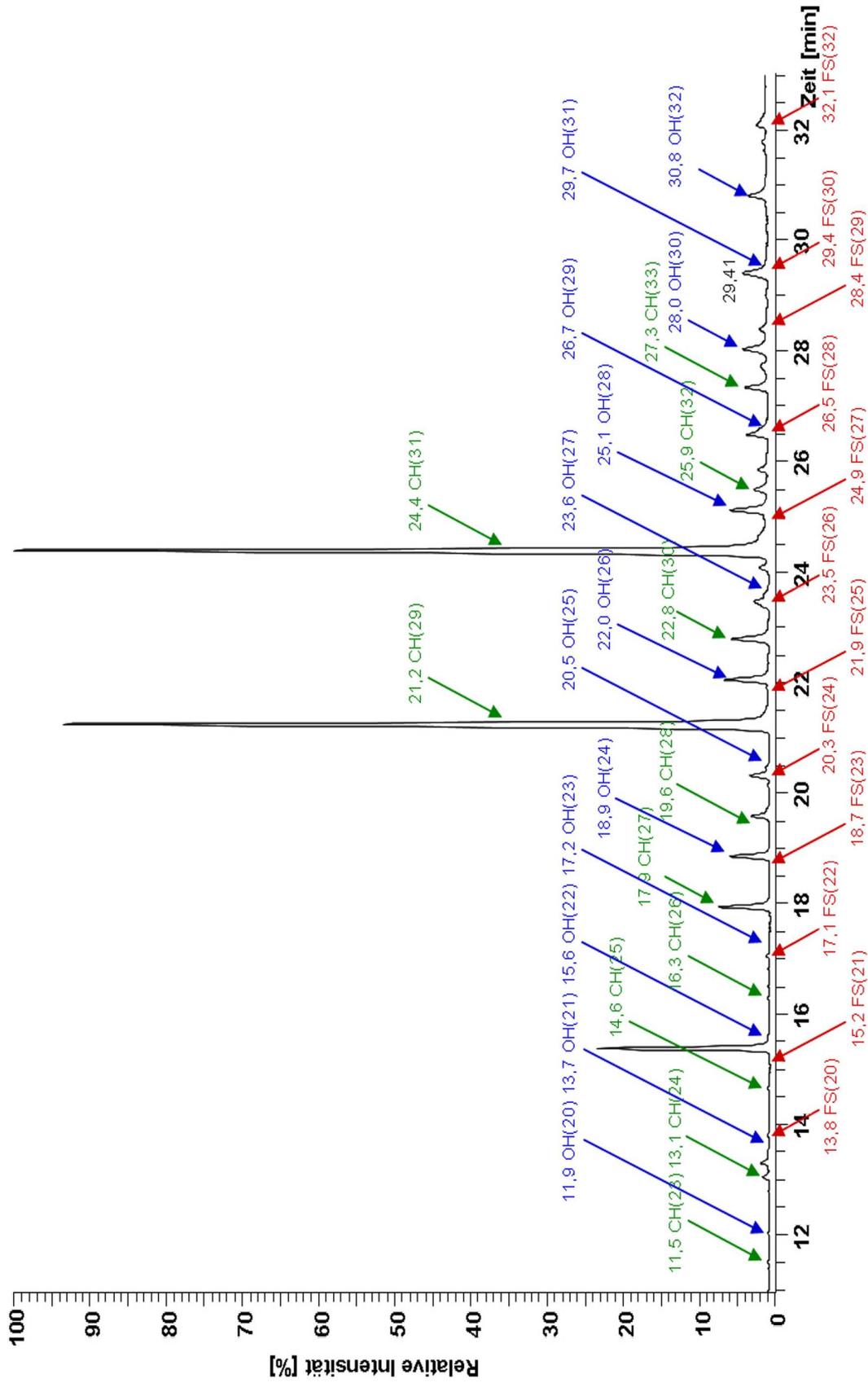


Abb. 47: Chromatogramm des unbehandelten, epikutikularen Wachsextraktes des Kirschlorbeers (GC-MS-System I, DB-5ms-Säule, Heizprogramm AF_2). Benannt sind die häufigsten Alkane (CH, grün), n-Alkohole (OH, blau) und Fettsäuren (FS, rot).

Alkane Kettenlänge	Korrekturfaktor (KF)	Peakflächenverhältnisse		%
		$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ ohne KF	$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ mit KF	
23	1	0,0040	0,0040	0,3
24	1	0,0259	0,0259	1,7
25	1	0,0590	0,0590	3,8
26	1	0,0504	0,0504	3,3
27	1	0,1148	0,1148	7,4
28	1	0,0616	0,0616	4,0
29	1	0,6583	0,6583	42,6
30	1	0,0495	0,0495	3,2
31	1	0,4505	0,4505	29,2
32	1	0,0271	0,0271	1,8
33	1	0,0426	0,0426	2,8
gesamt CH	-	1,5436	1,5436	100,0

Tab. 20: Korrekturfaktoren (siehe Kapitel 5.2.5), Peakflächenverhältnisse und prozentuale Verteilung der Alkane im unbehandelten epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (PL1-PL4, GC-MS-System III, ZB-1ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_1).

n-Alkohole Kettenlänge	Korrekturfaktor (KF)	Peakflächenverhältnisse		%
		$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ ohne KF	$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ mit KF	
20	0,9700	0,0025	0,0026	0,7
21	0,9714	0,0050	0,0052	1,3
22	0,9727	0,0066	0,0068	1,8
23	0,9739	0,0020	0,0021	0,5
24	0,9750	0,0964	0,0988	25,4
25	0,9760	0,0057	0,0058	1,5
26	0,9769	0,1009	0,1033	26,6
27	0,9778	0,0062	0,0064	1,6
28	0,9786	0,0542	0,0554	14,3
29	0,9793	0,0158	0,0161	4,1
30	0,9800	0,0354	0,0361	9,3
31	0,9806	0,0195	0,0199	5,1
32	0,9813	0,0296	0,0302	7,8
gesamt OH	-	0,3798	0,3886	100,0

Tab. 21: Korrekturfaktoren (siehe Kapitel 5.2.5), Peakflächenverhältnisse und prozentuale Verteilung der primären Alkohole im unbehandelten epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (PL1-PL4, GC-MS-System III, ZB-1ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_1).

Fettsäuren Kettenlänge	Korrekturfaktor (KF)	Peakflächenverhältnisse		%
		$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ ohne KF	$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ mit KF	
20	0,935	0,0231	0,0243	10,4
21	0,9444	0,0061	0,0064	2,7
22	0,9500	0,0189	0,0198	8,5
23	0,9524	0,0101	0,0106	4,5
24	0,9545	0,0434	0,0453	19,4
25	0,9565	0,0103	0,0107	4,6
26	0,9583	0,0379	0,0394	16,9
27	0,9600	0,0116	0,0121	5,2
28	0,9615	0,0288	0,0299	12,8
29	0,9630	0,0064	0,0066	2,8
30	0,9643	0,0254	0,0263	11,3
32	0,9667	0,0016	0,0017	0,7
gesamt FS	-	0,2236	0,2329	100,0

Tab. 22: Korrekturfaktoren (siehe Kapitel 5.2.5), Peakflächenverhältnisse und prozentuale Verteilung der Fettsäuren im unbehandelten epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (PL1-PL4, GC-MS-System III, ZB-1ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_1).

Substanzklasse	A_{gesamt} nach KF	Mol-%	Mass-%	Oberflächenbedeckung [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
Alkane	1,5436	71,3	34,6	4,80
n-Alkohole	0,3886	17,9	33,1	4,59
Fettsäuren	0,2329	10,8	32,3	4,49

Tab. 23: Peakflächenverhältnisse, Mol-% und Mass-% und Oberflächenbedeckung der einzelnen Substanzklassen im unbehandelten epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers.

9.4 Identifikation der unbekanntesten Verbindungen

Probenname	Auswaage [mg]	Oberflächenbedeckung [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	Reduktionsmittel
PL5	1,8	14,44	LiAlH ₄
PL6	1,7	13,64	LiAlH ₄
PL7	1,9	15,24	LiAlH ₄
PL8	1,7	13,64	LiAlH ₄
MW \pm SD	1,8 \pm 0,1	14,24 \pm 0,77	-
PL9	1,7	13,64	LiAlD ₄
PL10	1,8	14,44	LiAlD ₄
PL11	1,8	14,44	LiAlD ₄
PL12	1,6	12,84	LiAlD ₄
MW \pm SD	1,7 \pm 0,1	13,84 \pm 0,77	-

Tab. 24: Auswaagen der Kirschchlorbeerextrakte PL5-PL12, errechnete Oberflächenbedeckungen der epikutikularen Wachse und eingesetzte Reduktionsmittel.

Substanzklasse	A _{gesamt} nach KF	Mol-%	Mass-%	Oberflächenbedeckung [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
Alkane	1,5436	65,5	26,6	3,69
n-Alkohole	0,3891	16,6	25,4	3,53
Fettsäuren	0,2391	9,9	24,9	3,45
Ester	0,1775	7,8	23,1	3,22

Tab. 25: Korrigierte Peakflächenverhältnisse, Mol-%, Mass-% und Oberflächenbedeckung der einzelnen Substanzklassen im unbehandelten epikutikularen Wachs des Kirschchlorbeers.

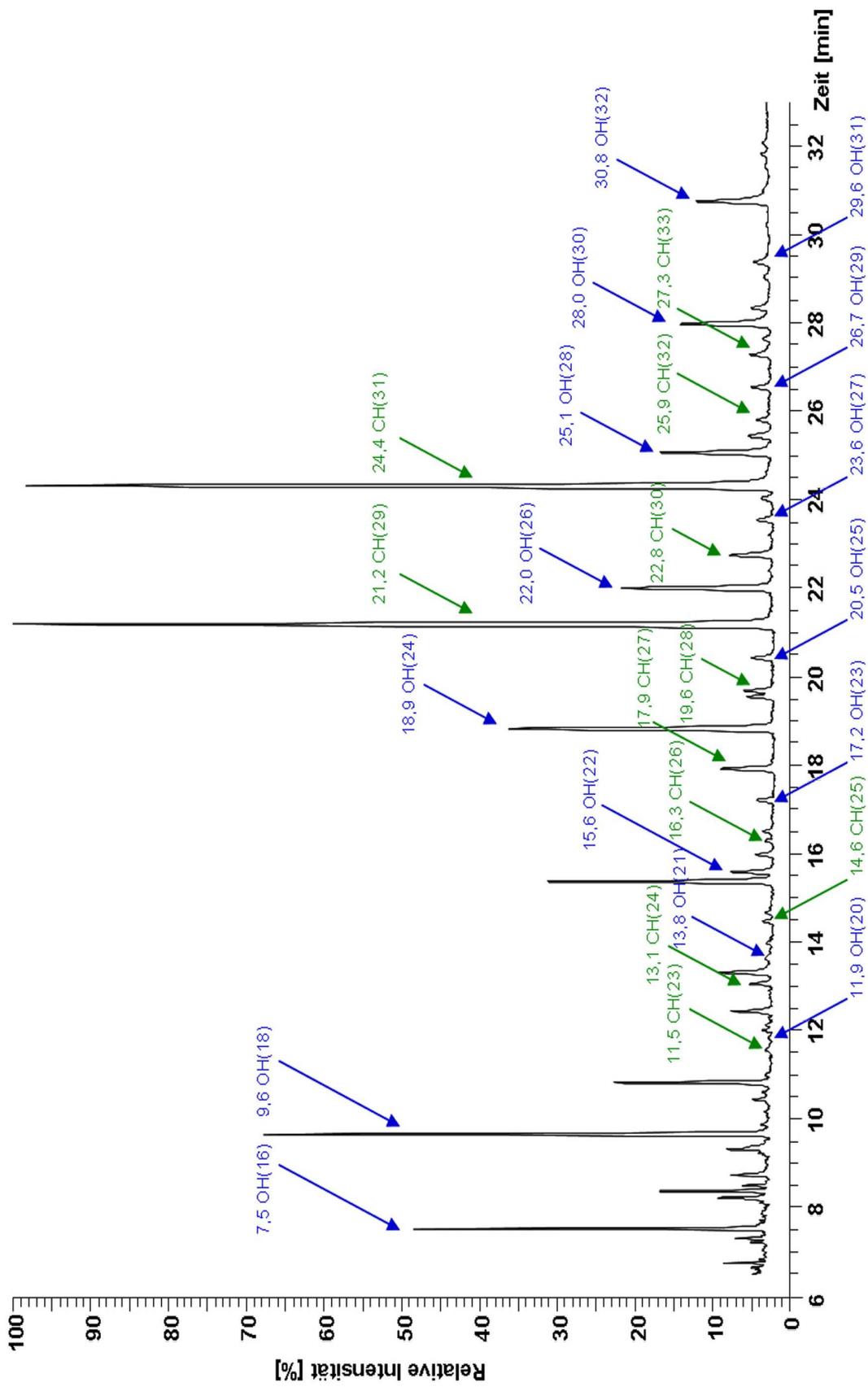


Abb. 48: Chromatogramm des epikutikulären Wachsextraktes des Kirschlorbeers nach LiAlH_4 -Reduktion (GC-MS-System I, DB-5ms-Säule, Heizprogramm AF_2). Benannt sind die häufigsten Alkane (CH, grün), n-Alkohole (OH, blau).

Alkane Kettenlänge	Korrekturfaktor (KF)	Peakflächenverhältnisse		%
		$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std. ohne KF}}$	$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std. mit KF}}$	
23	1	0,0074	0,0074	0,5
24	1	0,0301	0,0301	1,9
25	1	0,0625	0,0625	4,0
26	1	0,0578	0,0578	3,7
27	1	0,1312	0,1312	8,4
28	1	0,0688	0,0688	4,4
29	1	0,6390	0,6390	40,9
30	1	0,0507	0,0507	3,2
31	1	0,4698	0,4698	30,0
32	1	0,0236	0,0236	1,5
33	1	0,0232	0,0232	1,5
gesamt	-	1,5642	1,5642	100,0

Tab. 26: Korrekturfaktoren (siehe Kapitel 5.2.5), Peakflächenverhältnisse und prozentuale Verteilung der Alkane nach LiAlH₄-Reduktion des epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (PL5-PL8, GC-MS-System III, ZB-1ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_1).

Alkane Kettenlänge	Korrekturfaktor (KF)	Peakflächenverhältnisse		%
		$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std. ohne KF}}$	$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std. nach KF}}$	
23	1	0,0074	0,0074	0,5
24	1	0,0302	0,0302	1,9
25	1	0,0618	0,0618	4,0
26	1	0,0580	0,0580	3,7
27	1	0,1311	0,1311	8,5
28	1	0,0683	0,0683	4,4
29	1	0,6365	0,6365	41,1
30	1	0,0507	0,0507	3,3
31	1	0,4686	0,4686	30,3
32	1	0,0116	0,0116	0,8
33	1	0,0230	0,0230	1,5
gesamt	-	1,5472	1,5472	100,0

Tab. 27: Korrekturfaktoren (siehe Kapitel 5.2.5), Peakflächenverhältnisse und prozentuale Verteilung der Alkane nach LiAlD₄-Reduktion des epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (PL9-PL12, GC-MS-System III, ZB-1ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_1).

n-Alkohole Kettenlänge	Korrekturfaktor (KF)	Peakflächenverhältnisse		%
		$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ ohne KF	$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std.}}$ nach KF	
16	0,9625	0,0149	0,0155	1,5
18	0,9667	0,0211	0,0218	2,2
20	0,9700	0,0422	0,0435	4,3
21	0,9714	0,0119	0,0122	1,2
22	0,9727	0,0838	0,0862	8,5
23	0,9739	0,0164	0,0168	1,7
24	0,9750	0,2356	0,2417	23,9
25	0,9760	0,0226	0,0231	2,3
26	0,9769	0,2267	0,2320	23,0
27	0,9778	0,0194	0,0198	2,0
28	0,9786	0,1222	0,1249	12,4
29	0,9793	0,0238	0,0243	2,4
30	0,9800	0,0790	0,0807	8,0
31	0,9806	0,0238	0,0243	2,4
32	0,9813	0,0417	0,0425	4,2
gesamt	-	0,9851	1,0093	100,0

Tab. 28: Korrekturfaktoren (siehe Kapitel 5.2.5), Peakflächenverhältnisse und prozentuale Verteilung der primären Alkohole nach LiAlH_4 -Reduktion des epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (PL5-PL8, GC-MS-Systems III, ZB-1ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_1).

n-Alkohole Kettenlänge	Korrekturfaktor (KF)	Peakflächenverhältnisse		%
		$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ ohne KF	$A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Std}}$ nach KF	
16	0,9625	0,0149	0,0155	1,5
18	0,9667	0,0209	0,0217	2,1
20	0,9700	0,0421	0,0434	4,3
21	0,9714	0,0118	0,0122	1,2
22	0,9727	0,0840	0,0864	8,6
23	0,9739	0,0163	0,0167	1,7
24	0,9750	0,2355	0,2415	23,9
25	0,9760	0,0223	0,0229	2,3
26	0,9769	0,2275	0,2329	23,1
27	0,9778	0,0195	0,0200	2,0
28	0,9786	0,1227	0,1254	12,4
29	0,9793	0,0234	0,0239	2,4
30	0,9800	0,0789	0,0806	8,0
31	0,9806	0,0240	0,0245	2,4
32	0,9813	0,0415	0,0423	4,2
gesamt	-	0,9857	1,0099	100,0

Tab. 29: Korrekturfaktoren (siehe Kapitel 5.2.5), Peakflächenverhältnisse und prozentuale Verteilung der primären Alkohole nach LiAlD₄-Reduktion des epikutikularen Wachs des Kirschlorbeers (PL9-PL12, GC-MS-System III, ZB-1ms-GC-Säule, Heizprogramm AF_1).

9.5 Kombinierte Imaging FT-IR- und MALDI-TOF-MS zur Analyse der Blattoberfläche des Kirschlorbeers

9.5.1 Analyse der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers

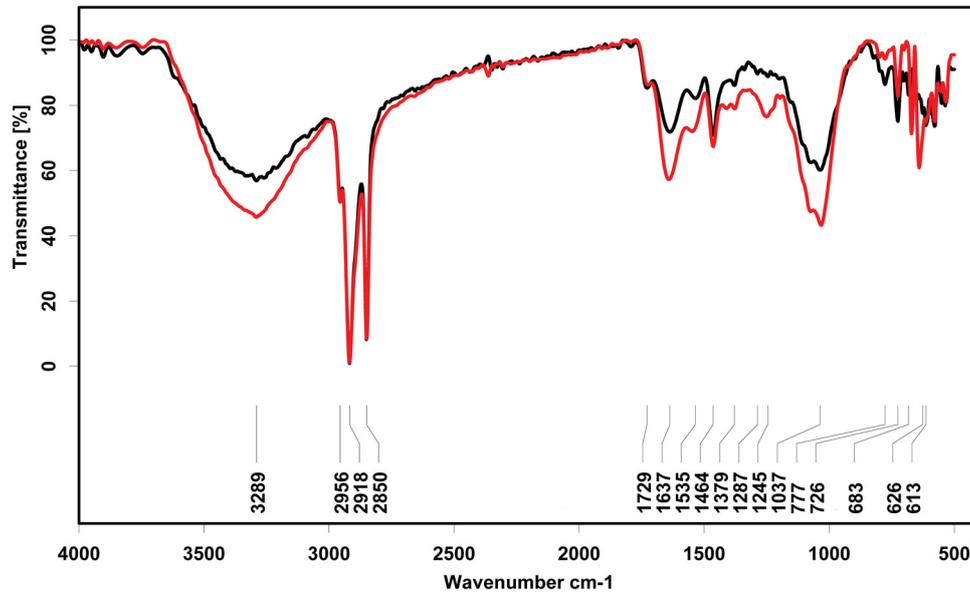


Abb. 49: Transmissions-FT-IR-Spektren der epikutikulären Blattwache der adaxialen Blattoberfläche des Kirschlorbeers auf der Lamina (schwarz) und der Hauptblattader (rot).

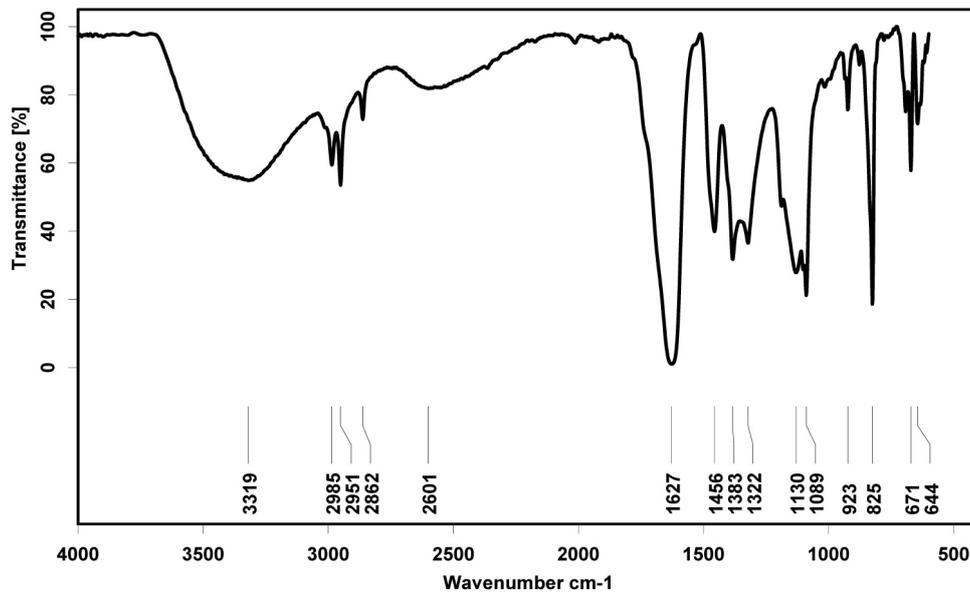


Abb. 50: Transmissions-FT-IR-Spektrum von Natriumcarbonat (Na₂CO₃) auf dem ZnS-Substrat. Beispielspektrum möglicher anorganischer Verunreinigungen auf der Blattoberfläche.

9.6 Untersuchung von Wundheilungsprozessen der pflanzlichen Kutikula

9.6.1 Reaktion der Blattoberfläche auf mechanischer Verwundung

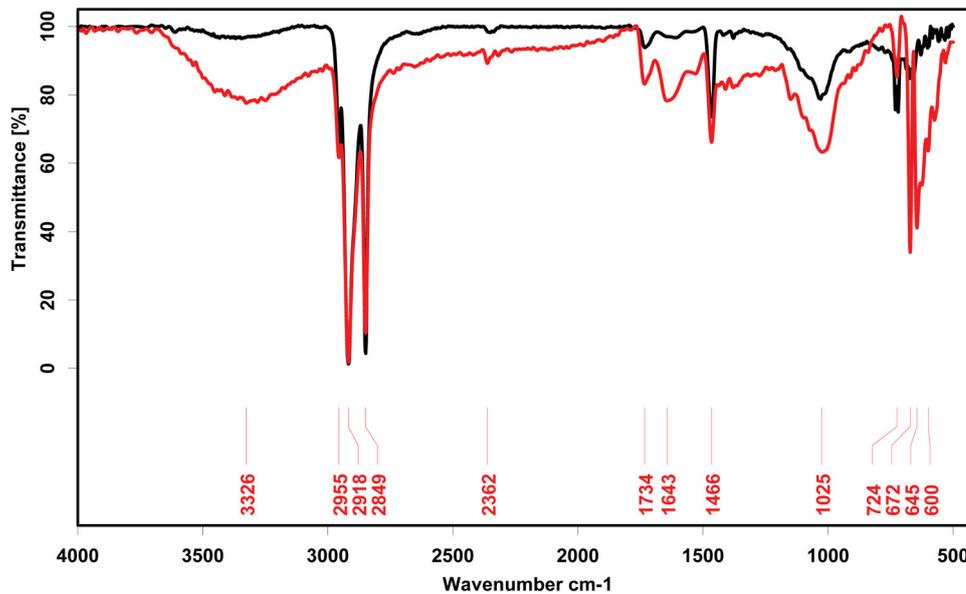


Abb. 51: Transmissions-FT-IR-Spektrum der Epikutikularwache bei $t=72$ h am Randgewebe der mechanischen Verwundung (rot) im Vergleich zur unbeschädigten Blattoberfläche in 5mm Distanz zur Läsion (schwarz).

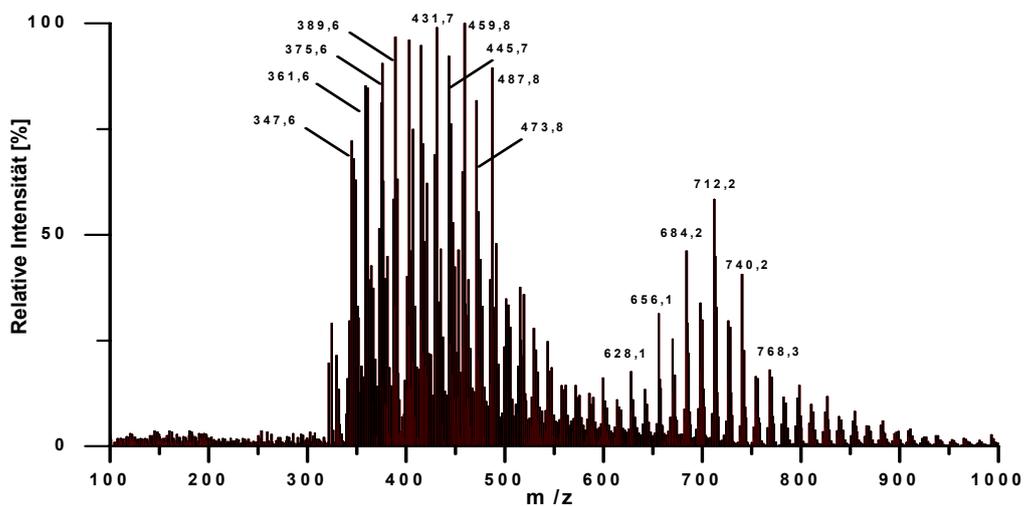


Abb. 52: MALDI-Massenspektrum der Epikutikularwache des Kirschlorbeers bei $t=72$ h am Randgewebe der mechanischen Verwundung.

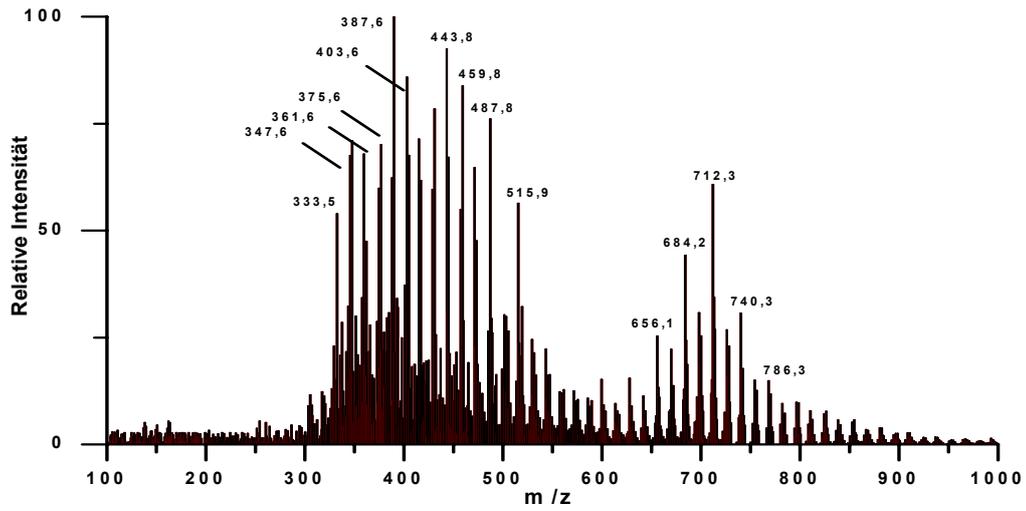


Abb. 53: MALDI-Massenspektrum der Epikutikularwachse des Kirschlorbeers bei $t=72$ h auf der unbeschädigten Blattoberfläche in 5 mm Distanz zur Läsion.

9.6.2 Reaktion der Blattoberfläche auf Pilzbefall

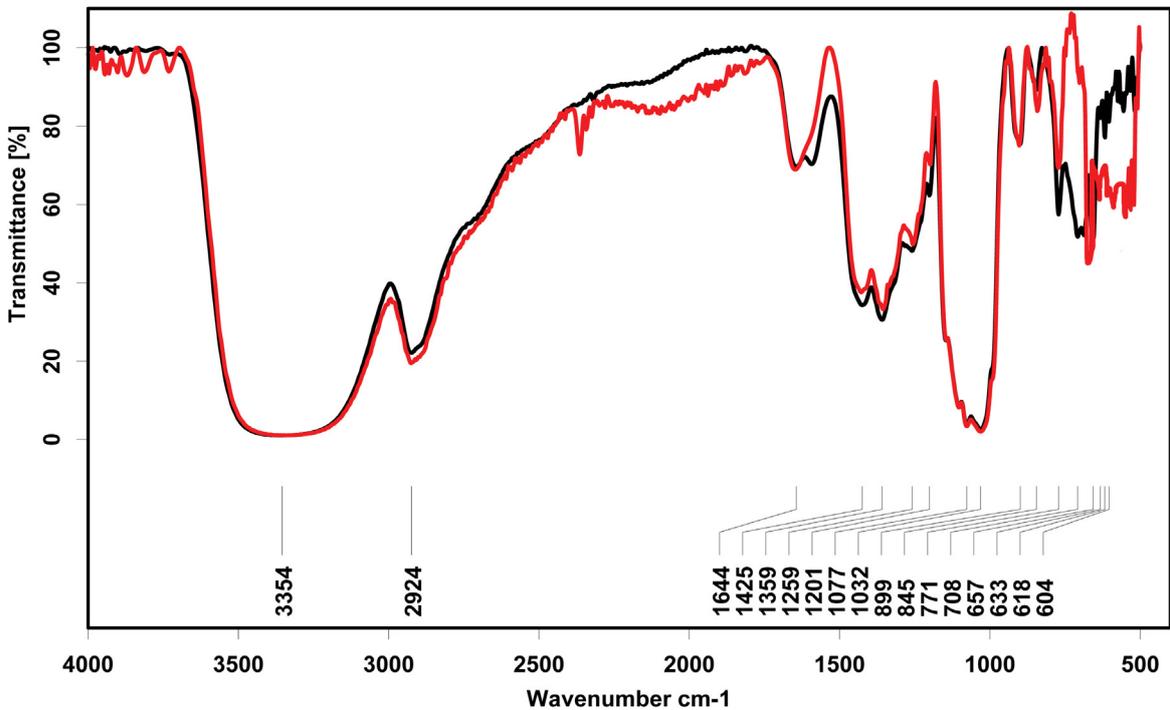


Abb. 54: Transmissions-FT-IR-Spektren von D-(+)-Glucose (rot) und L-(+)-Arabinose (schwarz).